



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA**

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN ALIMENTICIA DE DOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN PASTOREO
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE
GAS**

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN
GANADERA**

Presenta:

BRICIA PLATA ANAYA

Bajo la supervisión de:
Luis Alberto Miranda Romero, Dr.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
JEFATURA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Junio 2017
Chapingo, México.

**CARACTERIZACIÓN ALIMENTICIA DE DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN
EN PASTOREO MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS**

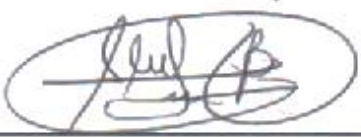
Tesis realizada por **BRICIA PLATA ANAYA** bajo la supervisión del comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: 
Dr. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

ASESOR: 
Ph. D. RICARDO DANIEL AMÉNDOLA MASSIOTTI

ASESOR: 
Dr. GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

ASESOR: 
Dr. ALEJANDRO LARA BUENO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, a través del Posgrado en Producción Animal por darme la oportunidad de formar parte de su comunidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de mis estudios de maestría.

Al comité tutorial por los grandes aportes y dedicación para la realización de esta investigación.

A los profesores del Posgrado en Producción Animal por la formación académica.

Al personal encargado del Módulo de Leche en Pastoreo de la UACH por el apoyo brindado.

Al personal del laboratorio de microbiología del departamento de zootecnia por su amistad y apoyo brindados.

A los compañeros y amigos del posgrado, por su compañía, amistad y aprendizaje.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Bricia Plata Anaya
Fecha de nacimiento	25 de septiembre de 1978
Lugar de nacimiento	Ciudad de México
CURP	PAAB780925MDFLNR11
Profesión	Médico Veterinario Zootecnista

Desarrollo académico

Médico Veterinario Zootecnista	Universidad Nacional Autónoma de México
2010	
Maestro en Ciencias en Innovación Ganadera	Universidad Autónoma Chapingo
2017	

CONTENIDO

Lista de Cuadros.....	vii
Lista de Figuras	viii
Resumen general.....	ix
General abstract	x
1 Introducción general	1
2 Revisión de literatura	3
2.1 Evaluación nutricional de los alimentos	3
2.2 Métodos de digestibilidad	4
2.2.1 Digestibilidad <i>in vivo</i>	4
2.2.2 Digestibilidad <i>in situ</i>	7
2.2.3 Digestibilidad <i>in vitro</i>	8
2.3 Técnica de producción de gas	9
2.3.1 Modelos matemáticos para determinar el volumen de gas	11
2.3.2 Predicción de la digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica y energía metabolizable	14
2.3.3 Fracciones fermentables	15
2.3.4 Determinación de metano y bióxido de carbono	16
2.3.5 Técnica de producción de gas como un indicador en la asimilación de alimento <i>in vivo</i>	18
2.4 Sistema de pastoreo mixto	19
2.5 Literatura citada	20

3	Características nutricionales y fermentativas de praderas alfalfa-ovillo en pastoreo mixto y monoespecífico.....	27
3.1	Resumen	27
3.2	Abstract.....	28
3.3	Introducción	29
3.4	Materiales y métodos.....	30
3.5	Resultados y discusión	33
3.6	Conclusiones	39
3.7	Literatura citada	40
4	Edad de praderas y sistema de pastoreo sobre asimilación de forraje estimada por producción de gas	42
4.1	Resumen	42
4.2	Abstract.....	43
4.3	Introducción	44
4.4	Material y métodos	45
4.5	Resultados y discusión	50
4.6	Conclusiones	54
4.7	Literatura citada	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Modelos matemáticos usados para describir la producción de gas <i>in vitro</i>	13
Cuadro 2. Cantidad y composición botánica del forraje de praderas jóvenes y maduras de alfalfa-ovillo después de ser pastoreadas en sistema mixto o monoespecífico.....	34
Cuadro 3. Proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), cenizas (Ce), fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA) de forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.....	36
Cuadro 4. Variables de producción de gas y digestibilidades <i>in vitro</i> de la MS y MO del forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.	38
Cuadro 5. Fracciones fermentables del forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.....	39
Cuadro 6. Composición química del concentrado y el heno de alfalfa ofrecido posterior a la ordeña.	46
Cuadro 7. Parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica (DIVMO) del forraje ofrecido y residual de alfalfa-ovillo, en dos sistemas de pastoreo.	50
Cuadro 8. Parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica del forraje ofrecido y residual de una pradera de alfalfa-ovillo de diferente edad.	51
Cuadro 9. Consumo aparente de la materia seca y orgánica, digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica, asimilación mediante gas de fermentación e índice de emisión potencial de gases de fermentación de forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de alfalfa en praderas jóvenes y maduras de alfalfa-ovillo, después de ser pastoreadas en un sistema mixto o monoespecífico.	35
Figura 2. Proporción de cenizas en forraje de praderas jóvenes y maduras de alfalfa-ovillo, en pastoreo mixto (Pmx) o monoespecífico (Pmn).	37

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN ALIMENTICIA DE DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN PASTOREO MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS

La técnica de producción de gas (TPG) no ha sido usada para evaluar el efecto del pastoreo en la calidad y asimilación de praderas. El objetivo fue evaluar el pastoreo mixto (Pmx; 5 vacas y 18 borregas) y mono-específico (Pmn; 5 vacas) en la calidad y asimilación de praderas de dos edades (jóvenes y maduras), en un diseño de parcelas divididas. La parcela mayor fue la edad de la pradera con seis repeticiones y la parcela menor, el tipo de pastoreo con dos repeticiones. Se usó pastoreo rotacional con tres y 32 días de ocupación y descanso respectivamente, y $7.9 \text{ kg vaca}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de suplemento. Se tomaron muestras de forraje ofrecido para determinar: composición botánica, masa de forraje (kg ha^{-1}); PC, EE, Cenizas, FDN y FDA, volumen máximo (V_m ; mL g^{-1}), tasa (S ; h^{-1}) y fase lag (L , h) de la fermentación *in vitro*. También se tomaron muestras de forraje residual y heces- Cr_2O_3 para calcular la digestibilidad aparente de materia seca, y su V_m . La asimilación (ASIV_m ; mL g^{-1}) de la pradera y el índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF; $\text{hL lote}^{-1} \text{ d}^{-1}$), se estimaron como: $\text{ASIV}_m = V_m \text{AT} - V_m \text{heces}$; $\text{IEPGF} = (V_m \text{AT} * \text{kg MS AT}) - (V_m \text{heces} * \text{kg MS heces})$, donde $\text{AT} = \text{forraje} + \text{suplemento}$. El tipo de pastoreo afectó ($p < 0.05$) la masa de forraje, la proporción de alfalfa y pasto ovillo. En praderas jóvenes la proporción de alfalfa fue mayor. El tipo de pastoreo y la edad de la pradera no afectaron ($p > 0.05$) las características nutritivas y de fermentación, pero sí afectaron ($p < 0.05$), la MS residual, la cantidad de heces y la digestibilidad aparente de la MS. El Pmx indujo mayor ($p < 0.05$) IEPGF, indicando un impacto al ambiente, mayor asimilación y masa microbiana. La TPG ofrece más información útil para caracterizar sistemas de pastoreo.

Palabras clave: fermentación *in vitro*, pastoreo mixto, edad de praderas, nutrientes, asimilación.

GENERAL ABSTRACT

FEEDING CHARACTERIZATION OF TWO PRODUCTION GRAZING SYSTEMS THROUGH THE GAS PRODUCTION TECHNIQUE

The gas production technique (TPG) has not been previously used to evaluate the effect of grazing on the quality and assimilation of grasslands herbage. The objective of this study was to evaluate mixed (Pmx, 5 cows and 18 ewes) and monospecific grazing (Pmn; 5 cows) on the quality and assimilation of herbage of two grasslands of different ages (young and mature) in a split plot design. The largest plot was the age of grasslands with six replicates and the smaller plot was the grazing type with two replicates. Rotational grazing was used with three days and 32 of grazing and resting respectively, 7.9 kg cow⁻¹ of supplementary feed were offered daily. Samples of herbage on offer were taken to determine: botanical composition, herbage mass (kg ha⁻¹); crude protein, ashes, ether extract, NDF, ADF and gas production (Vm; mL g⁻¹), fermentation rate (S, h⁻¹) and lag phase (L, h) on *in vitro* fermentation technique. Samples of residual forage and feces were also taken to calculate the dry matter digestibility and its gas production. Herbage assimilation (ASIVm; mL g⁻¹) and the potential emission rate of fermentation gases (IEPGF; hL batch⁻¹ d⁻¹) were estimated as: ASIVm = VmAT - Vmheces; IEPGF = (VmAT * kg MS AT) - (Vm feces * kg MS feces), where AT = forage + supplement. The grazing type affected herbage mass (p<0.05) and the proportion of alfalfa and orchard grass. Alfalfa proportion was higher in young grassland than in older ones. The grazing system and age of grasslands did not affect nutritional and fermentative characteristics of herbage, but had positive effect (p<0.05) on total feed intake, residual dry matter, feces production and apparent dry matter degradability. Pmx increase (p<0.05) IEPGF, which means environmental impact, greater assimilation and increment in ruminal microbial production. In conclusion TPG offers useful information to characterize grazing systems.

Key words: *in vitro* fermentation, mixed grazing, age grasslands, nutrients, assimilation herbage.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas de producción de leche de bovinos en pastoreo son una alternativa de producción, debido a que su principal recurso, los pastos, son la fuente de alimento disponible a bajo costo, de ahí que la caracterización nutricional de los forrajes sea un aspecto de capital importancia para estos sistemas (Soder & Rotz& 2001).

El desempeño productivo de las vacas lecheras está en función del valor nutricional de la dieta que consumen. El valor nutricional de los forrajes está determinado por la concentración de nutrientes y la digestibilidad. La evaluación nutricional del forraje puede realizarse por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Dentro de las técnicas *in vitro*, se encuentra la técnica de producción de gas (TPG), la cual a diferencia de otras técnicas *in vitro* e *in situ*, no sólo determina la extensión, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado, producto de la fermentación (Getachew, Blummel, Makkar & Becker, 1998).

La TPG *in vitro* es rentable, de fácil determinación y adecuado para sus uso en los países en desarrollo. Este método permite predecir el consumo de alimento, la digestibilidad, la energía metabolizable (EM), el suministro de nitrógeno microbiano y la cinética de fermentación (Abaş, Özpınar, Kutay, Kahraman, & Eseceli, 2005; Kamalak, Canbolat, Gurbuz, & Ozay, 2005). Uno de los efectos de la fermentación de los forrajes en rumiantes es la producción de gases de efecto invernadero, siendo el gas metano uno de los más importantes, mismo que también puede ser evaluado por la TPG (Posada & Noguera, 2005).

Sin embargo, recientemente se investiga la aplicación de la TPG como indicador de la asimilación de la dieta *in vivo* (Miranda *et al.*, 2015c) y la cuantificación de las fracciones fermentables (Miranda *et al.*, 2015a; Miranda *et al.*, 2015b). No se tienen registros del uso de la TPG como herramienta o marcador para estimar la asimilación del forraje en rumiantes en pastoreo, por

lo que el objetivo de ésta investigación fue determinar los componentes botánicos, nutricionales y fermentativos *in vitro* del forraje consumido por vacas en producción de leche bajo los sistemas de pastoreo mixto y monoespecífico, y por medio de la producción de gas *in vitro* determinar la asimilación de la dieta de vacas para ambos sistemas de pastoreo.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Evaluación nutricional de los alimentos

El comportamiento productivo de la vaca lechera está relacionado con la calidad de los alimentos, principalmente de los forrajes, que es la principal fuente de alimento de los sistemas basados en pastoreo (Getachew *et al.*, 1998). Sin embargo, nutritivamente los forrajes presentan una composición muy variable, comparada con cualquier otro alimento, siendo múltiples los factores que pueden afectar la calidad nutricional como edad, suelo, clima y manejo de pastoreo (Barahona & Sánchez, 2005). El potencial del recurso forrajero para el comportamiento productivo de los animales depende de su contenido de nutrientes, digestibilidad y del consumo voluntario (Baumont *et al.*, 2000).

Frecuentemente, la evaluación de la calidad del alimento se realiza mediante la cuantificación de la composición nutricional y digestibilidad, pero el conocimiento en la fisiología digestiva y su influencia en la utilización de nutrientes, permite orientar el desarrollo de técnicas para la evaluación dirigidas hacia la imitación en el destino de los nutrientes de los alimentos en el tracto digestivo. Éstos enfoques reducen la dependencia del uso de los animales y mejoran la flexibilidad de la evaluación en la alimentación (Krishnamoorthy *et al.*, 2005).

Se han descrito diversos métodos para determinar la dinámica de degradación de los forrajes que consumen los rumiantes, los cuales son importantes para orientar los estudios de nutrición para estas especies animales. Estas técnicas de digestibilidad presentan ventajas como la predicción del consumo, determinación de la calidad del alimento, estudio de los constituyentes de los alimentos, predicción de la digestibilidad, estudio de la cinética de fermentación, emisión de gases, entre otros (Bayona *et al.*, 2013).

2.2 Métodos de digestibilidad

La búsqueda de un método simple, económico y fiable para evaluar el valor nutritivo de los forrajes para rumiantes ha sido compleja. La degradación microbiana de los forrajes en el rumen es un proceso que implica complejas interacciones entre los microorganismos (bacterias, protozoos y hongos) y entre la población microbiana y el huésped (Williams, 2000).

Para desarrollar un método fiable, los resultados de los últimos 40 años proporcionan información sobre los factores que deben considerarse cuando se trata de simular el ambiente ruminal como son temperatura, pH, capacidad tampón, fuente de nitrógeno y anaerobiosis. Las técnicas de laboratorio existentes se concentran en la estimación de la degradación ruminal. La razón principal es que el forraje consiste principalmente en carbohidratos estructurales que solo pueden ser digeridos por los microorganismos del rumen. Sin embargo, la degradabilidad efectiva (la digestibilidad que se puede esperar en vivo) también depende de la tasa de degradación, el potencial de degradabilidad y la tasa fraccional de fermentación (Williams, 2000).

2.2.1 Digestibilidad *in vivo*

La digestibilidad puede ser definida como la fracción de un alimento que se aprovecha a través de su paso por el tracto digestivo, y se determina por la cuantificación de la cantidad de alimento consumido y la cantidad de heces evacuadas, después que el animal se ha adaptado a la dieta en cuestión (McSweeney & Mackie, 2012). Una vez degradados los nutrientes de los forrajes, la digestibilidad hace referencia a la cantidad de alimento que desaparece en el tracto digestivo o en un procedimiento de laboratorio debido a la solubilización o ataque por los microorganismos anaerobios ruminales. La digestibilidad de los forrajes permite estimar la proporción de nutrientes presentes en el alimento, que tienen potencial de ser absorbidos por el tracto digestivo (Giraldo *et al.*, 2007).

La colección total de heces es el método más confiable en la medición de la digestibilidad de los alimentos debido a que en esta técnica se consideran la mayoría de factores del proceso de digestión como el ambiente del tracto gastrointestinal, tasa de pasaje, de digestión, consumo voluntario, tipo de alimento, población microbiana, especie y estado fisiológico de los animales (Meneses, 2000). Sin embargo esta técnica es costosa, lenta y requiere animales en jaulas metabólicas. La técnica se basa en conocer la cantidad de alimento que consume el animal y la cantidad de heces colectadas en la jaula diariamente. Se requiere llevar registros precisos del alimento ingerido, rechazado y producción fecal. Cuando se requieren estimaciones del balance de nitrógeno, también se mide la producción de orina. Para ello, se requieren como mínimo tres animales por alimento en estudio. Los animales se habitúan con el alimento de 7 a 21 días antes de recolectar las primeras muestras (Meneses 2000).

$$\text{Digestibilidad (\%) del nutriente} = \frac{\text{consumo del nutriente} - \text{nutriente en heces}}{\text{consumo del nutriente}} \times 100$$

Sin embargo, una crítica común de la estimación de la digestión por la técnica de recolección total es que la ingesta de alimento por los animales es a veces anormalmente baja y errática. Esta falta de apetito es en muchos casos atribuible al hecho de que el animal puede estar demasiado nervioso o asustado para comer, como resultado del estrecho confinamiento necesario debido a la naturaleza misma del equipo utilizado. A pesar de que los ensayos convencionales de digestión son el estándar con el que se comparan todas las demás medidas de digestibilidad, los valores obtenidos varían todavía de ± 1 a 4% como resultado de la variación de animal a animal, procedimientos de muestreo y errores analíticos (Khan, Mahr-Un-Nisa & Sarwa, 2003).

Ésta técnica se dificulta cuando se tiene manejo en sistemas de pastoreo, y más aún en animales de talla grande como los bovinos. Debido a lo anterior, se desarrollaron métodos que facilitan la determinación de la digestibilidad en el

sistema antes mencionado. El principio básico es usar sustancias que pasen por el tracto digestivo a una velocidad constante y sin absorción llamados marcadores (Bayona *et al.*, 2013).

Los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos químicos y físicos de la digestión, estimar el flujo de la digestión, digestibilidad parcial o total y la producción fecal en diversas especies animales. Los marcadores minimizan la interferencia con los patrones de comportamiento animal y simplifican los procedimientos. Los marcadores pueden ser internos o externos; los internos son constituyentes naturales de los alimentos como sílice, lignina, nitrógeno fecal, cromógenos fibras detergentes neutras y ácidas indigestibles, cenizas insolubles en ácido y N-alcanos; los externos son compuestos inertes como el óxido de cromo (Rodríguez *et al.*, 2007).

El óxido de cromo se propuso como indicador en estudios de vacas lecheras para ensayos de digestibilidad desde 1918. La concentración de éste indicador en los alimentos es baja, en torno a 0.1 µg/g. La ventaja del uso de esta sustancia es que se incorpora fácilmente a las dietas y es analizada con relativa facilidad. Algunas limitaciones son: la baja recuperación fecal, principalmente en función de la variabilidad de los resultados obtenidos y a la variación diurna de su excreción en las heces, lo que puede ser evitado dando el indicador dos veces al día. Algunos trabajos muestran que el óxido de cromo posee una tasa de pasaje más rápida por el rumen que el material fibroso y la posibilidad de su acumulación en alguna parte del tubo digestivo. Además, efectos carcinogénicos también han sido citados (Rodríguez *et al.*, 2007).

Debido a la variabilidad y al reducido número de muestras que se pueden analizar a la vez en la técnica *in vivo*, se ha trabajado en elaborar técnicas que simulen los procesos de digestibilidad. En los pasados 40 años se desarrollaron técnicas de laboratorio que simulan los procesos de degradación de los alimentos, de los cuales se destacan las técnicas *in vitro* como la de Tilley y

Terry (1963); la técnica de producción de gas (Menke & Steingass, 1988); las cuales usan microorganismos del rumen; la técnica de celulasa y pepsina (Aufrère & Michalet-Doreu, 1988; McLeod & Minson, 1978), y la técnica de incubación *in situ* de las muestras en bolsas de nylon en el rumen (Mehrez & Ørskov, 1977). Estas técnicas demostraron tener correlación con la digestibilidad de la materia orgánica y son usadas para la evaluación de los alimentos (Getachew *et al.*, 1998; Gosselink *et al.*, 2004).

2.2.2 Digestibilidad *in situ*

La técnica de la bolsa de nylon se ha usado por varios años para estimar la tasa y el potencial de degradación de la materia seca de los forrajes *in situ*. Para esta técnica, se usan bolsas de nylon que son depositadas con 2 o 3 g de alimento e incubadas dentro del rumen de animales fistulados, después las bolsas son removidas del rumen y lavadas. El tamaño del poro de la bolsa se tiene que considerar, y debe ser suficientemente pequeño para evitar el paso de alimento de la bolsa, pero lo suficientemente grande como para permitir la entrada del fluido ruminal con microorganismos, particularmente protozoarios (Khan *et al.*, 2003).

Seifried, Steingäß, y Rodehutschord (2015), demostraron que bolsas con poros de 50 y 30 μm , en ensayos con maíz, trigo y cebada conducían a la pérdida sustancial de partículas de almidón durante la incubación, pero con poros de 20 y 6 μm dicha pérdida se anulaba. Sin embargo, debido a la pérdida alta de partículas por el lavado de las bolsas, el método *in situ* no fue adecuado para la medición de la degradación de almidón en avena al utilizar los tamaños de poro ensayado en este estudio, por lo que concluyeron que debe tenerse precaución cuando se utiliza la técnica *in situ* para las mediciones de la degradación ruminal del almidón de granos (Seifried *et al.*, 2015).

La desventaja del método *in situ*, es que una cantidad muy reducida de muestras puede ser analizada al mismo tiempo y requiere por lo menos tres animales fistulados para cuantificar las variaciones por animal. Al ser una

técnica altamente invasiva, puede afectar directamente el consumo de alimento por parte del animal, no permite evaluar alimentos con altos contenidos de material soluble, tamaño pequeño de partícula o con alto contenido de almidones y lípidos, una vez que este material puede escapar de las bolsas sin ser degradado. Por lo anterior, las técnicas *in vitro* son una alternativa en el estudio de la digestibilidad (Bayona *et al.*, 2013).

2.2.3 Digestibilidad *in vitro*

Las técnicas de digestibilidad *in vitro* proporcionan una predicción rápida, barata y precisa de la digestibilidad en comparación de la digestibilidad *in vivo*. El procedimiento *in vitro* hace un mejor trabajo de predicción que la composición química, porque explica todos los factores conocidos o desconocidos, que afectan la digestibilidad, lo que no es posible con los métodos químicos actuales (Khan, Mahr-Un-Nisa, & Sarwar, 2003).

La técnica de Tilley y Terry (1963) se convirtió en una herramienta importante para la evaluación de los alimentos de los rumiantes y se utiliza ampliamente por las ventajas que representa, particularmente cuando se requieren ensayos a gran escala de muestras. Este método implica dos etapas en la que los forrajes se someten a 48 horas de fermentación en una solución buffer que contiene líquido ruminal, seguido de 48 horas de digestión con pepsina en una solución ácida (Getachew, Blummel, Makkar, & Becker, 1998).

La técnica anterior fue modificada por Goering y Van Soest (1970) en donde el residuo obtenido después de 48 horas de incubación fue tratado con solución detergente neutro para estimar la digestibilidad de la materia seca verdadera. Aunque el método de Tilley y Terry ha sido validado con valores *in vivo*, no determina la dinámica de la fermentación (Getachew *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2003).

Las pruebas de digestibilidad enzimáticas (De Boever *et al.*, 1986; Dowman & Collins, 1982; Jones & Hayward, 1975) para estimar la digestibilidad de los

forrajes imita la degradación ruminal utilizando celulasas de hongos como *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*. Existen enzimas comerciales que permiten mayor precisión y menor tiempo de digestión que el método del líquido ruminal. Se han estudiado las variaciones en el método de la celulasa, centrándose principalmente en la concentración enzimática y el tiempo de incubación (Barchiesi-Ferrari, Alomar & Miranda, 2011). Los métodos enzimáticos se usan rutinariamente como procedimientos de digestibilidad final, sin embargo, el método enzimático puede ser insensible a factores tales como efectos asociativos y toxinas que pueden afectar a la degradación microbiana (Getachew *et al.*, 1998).

2.3 Técnica de producción de gas

Se tiene registros desde la década de los años 40's, de la medición de gas de fermentación ruminal (Quin, 1940; mencionado por Getachew *et al.*, 1998). Después de los trabajos de Menke *et al.* (1979), dónde se demostró una correlación alta entre la producción de gas *in vitro* y la digestibilidad aparente *in vivo*, la medición de gas se considera un método de rutina para la evaluación de los alimentos. La técnica de producción de gas (TPG) *in vitro* usada principalmente para la evaluación de alimentos, ha ganado reconocimiento general en la última década para investigar mecanismos de fermentación microbiana y para estudiar el modo de acción de factores anti-nutritivos, aditivos y suplementos alimenticios. La técnica se basa en el supuesto de que el gas producido en cultivos es directa o indirectamente, resultado de la fermentación de una cantidad dada de sustrato (López *et al.*, 2007).

La TPG y sus variantes presentan ventajas frente a otras técnicas de digestibilidad, porque explican las contribuciones de las fracciones de alimento soluble e insoluble, a la vez que proporcionan información sobre la dinámica de la fermentación. Además, cuando el contenido de nutrientes no es limitante, la producción de gas mide el crecimiento microbiano (Khan *et al.*, 2003).

La TGP propone la medición de la producción acumulada de gas, como indicador del metabolismo del carbono, centrando su atención en la acumulación de los productos finales de la fermentación: CO₂, CH₄, y ácidos grasos volátiles. Este sistema presenta la ventaja de que el producto final que se mide (gas) es el resultado directo del metabolismo microbiano, en lugar de registrar la desaparición del sustrato. Una segunda ventaja es que la formación de productos finales de la fermentación, se pueden monitorear a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descrita con mayor precisión (Makkar, 2002).

Cuando un alimento se incuba *in vitro* con fluido ruminal diluido en buffer reducido, se fermentan principalmente los carbohidratos para producir ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico), gases y células microbianas. La producción de gas a partir de la fermentación de proteínas es relativamente pequeña en comparación con la fermentación de carbohidratos. La contribución de la grasa a la producción de gas es básicamente insignificante. Cuando se incubaron 200 mg de aceite de coco, aceite de semilla de palma y/o aceite de soya, sólo se produjeron 2.0 a 2.8 mL de gas mientras que una cantidad similar de caseína y celulosa produjo aproximadamente 23.4 y 80 mL de gas, respectivamente (Makkar, 2002).

La eficacia de la TPG radica en que es un sistema *in vitro* de alta capacidad operativa y bajo costo, en la cual los perfiles de producción de gas pueden ser generados utilizando sistemas semi o totalmente automatizados. La determinación de los productos finales de la fermentación y los residuos no fermentados, en conjunto con los perfiles de producción de gas, permiten estimar la tasa, extensión y eficiencia de la fermentación (Bruni & Chilibróste, 2001).

Miranda-Romero *et al.*, (2015a) demostraron la factibilidad de usar la técnica de producción de gas (TPG) *in vitro* para estimar el contenido de tres grupos de

carbohidratos fermentables; solubles, de reserva y estructurales, tomando como carbohidratos de referencia para cada grupo a la glucosa, almidón y celulosa pura; los resultados mostraron que la TPG es precisa y sensible para determinar cambios en el contenido de carbohidratos fermentables en sustratos con alto o bajo contenido de carbohidratos como tuna y alfalfa. Sin embargo, existe poca investigación al respecto, sobre todo en forrajes.

La TPG se ha utilizado principalmente para determinar la producción de gas acumulado en estudios de cinética de digestión de forrajes y concentrados, pero no hay suficientes estudios realizados con ésta técnica en heces, para determinar la cinética de producción de gas y la asimilación con el consumo de forraje en vacas en pastoreo.

2.3.1 Modelos matemáticos para determinar el volumen de gas

Los datos de acumulación de gas *in vitro*, proporcionan información valiosa sobre la cinética de digestión de un alimento en el líquido ruminal. La extensión de la digestión de los carbohidratos depende de las características del alimento, incluyendo tanto su degradabilidad y la tasa de fermentación, y también sobre las tasas de consumo y pasaje del alimento. Existen diferentes modelos para estimar los parámetros de fermentación a través de las curvas de producción de gas, todos ellos con diferentes ajustes estadísticos dependiendo de las condiciones experimentales y el tipo de sustrato. El tipo de modelo a escoger no debe tener solamente las consideraciones de ajuste matemático, sino también la coherencia biológica de los parámetros. La mayoría de estos modelos son formas sigmoides, excepto el modelo exponencial (France *et al.*, 2000; Pitt *et al.*, 1999; Rosero-Noguera, 2007).

En cada curva sigmoidea que presenta la producción de gas se pueden distinguir tres fases: 1) la fase lenta o de nula producción de gas (fase inicial), 2) la fase de producción de gas rápida (fase exponencial), y 3) la fase en la cual la

proporción de gas se reduce y finalmente llega a cero (fase asintótica) (Beuvink & Kogutt, 1993).

Un modelo para describir el curso del tiempo de producción de gas acumulativo en una fermentación discontinua puede expresarse como una función del tiempo $F(t)$ multiplicado por un volumen final de gas V_F , que es el volumen de gas asintótico de la digestión de una cantidad dada de sustrato. Así se tiene que:

$$V(t) = V_F \times F(t),$$

Donde $V(t)$ es la producción de gas acumulado (mL) a partir de una masa dada de sustrato incubada durante el tiempo t , V_F el volumen final de gas (ml) de la digestión completa de una masa dada de sustrato, $F(t)$ la producción de gas y t el tiempo (h) (Pitt *et al.*, 1999).

La descripción matemática de las curvas de producción de gas permite analizar datos y la comparación de sustratos o las características del medio ambiente de la fermentación y de éste modo provee información útil relativa a la composición del sustrato y a las fracciones solubles de rápida, y fracciones de lenta fermentación del sustrato. Los modelos no lineales comúnmente usados para estimar la cinética de fermentación ruminal son modelos exponenciales, propuestas por Ørskov y McDonald (1979), Mertens y Loftén (1980), France *et al.* (1993), Beuvink y Kogut (1993); y el modelo de Gompertz, propuesto por Lavrenčič, Stefanon, y Susmel (1997); el único modelo propuesto por Schofield *et al.* (1994); el modelo de doble fuente propuesto por Schofield *et al.* (1994) y Groot *et al.* (1996) (Cuadro 1). Los modelos pueden asumir uno, dos o más compartimientos o fases de fermentación; además, los datos analizados por diferentes modelos pueden generar diferentes resultados (Peripolli *et al.*, 2011).

Sin embargo, se debe tener cuidado en la elección del modelo matemático más adecuado para el ajuste de las tasas de degradación, que pueden variar dependiendo del modelo (Velho *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Modelos matemáticos usados para describir la producción de gas <i>in vitro</i> .	
Modelos sugeridos por	Ecuaciones
Ørskov (exponencial)	$Y = a + b (1 - e^{-ct})$
Menke y Steingass (logístico)	$Y = a_1 / (1 + e^{(2-4c(t-T))})$
Von Bertalanffy	$Y = a_1 + b_1 (1 - e^{-ct})^{1/v}$
France	$Y = a_2 (1 - e^{(-b_2(t-T) - c_1(\sqrt{t} - \sqrt{T}))})$

Fuente: Mustafa *et al.*, (2011).

El modelo adecuado para ajustar los valores de la cinética de producción de gas obtenidos por la técnica *in vitro* debe ser capaz de modelar las variaciones en la curva sin punto de inflexión, así como curvas sigmoideas en el que el punto de inflexión es variable (Velho *et al.*, 2014).

Velho *et al.* (2014), en un estudio de comparación de modelos matemáticos (Exponencial, France, Gompertz y Logístico) concluyeron que la TPG *in vitro* fue eficiente para detectar diferencias en el valor nutricional de ensilajes de maíz de diferentes etapas de madurez y que el modelo Gompertz describió mejor la cinética de producción de gas que el modelo France, que fue el menos adecuado.

Por otro lado, Peripolli *et al.* (2014), en un estudio para identificar el modelo (Exponencial, France, Gompertz, Logístico y Modelos logísticos de doble fuente) que mejor se ajustara a la curva acumulativa de producción de gas en dietas de rumiantes, consistente en la sustitución del maíz por glicerol (0, 4, 8, y 12%) y con heno de alfalfa como forraje en un 60% de la dieta, encontraron que el modelo logístico de doble fuente, el modelo de Gompertz y logístico

mostraron los valores de r^2 más altos (0.99), así como el error cuadrático medio más bajo. Los modelos de France y de Gompertz tuvieron el error de porcentaje medio más bajo. El modelo logístico de doble fuente mostró la desviación media absoluta residual más baja y la eficiencia relativa mayor de 1.0 en todas las comparaciones y, por lo tanto, fue considerado el más eficiente de los modelos evaluados.

2.3.2 Predicción de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y energía metabolizable

Las ecuaciones de regresión se han usado para predecir la digestibilidad de los componentes químicos de los alimentos. Menke *et al.* (1979), encontraron alta precisión ($R = 0.98$, S.D. = 25) en la predicción de la digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica con el uso de las mediciones de gas *in vitro* y la composición química en una ecuación de regresión múltiple. Así también, reportaron una estrecha correlación entre la Energía Metabolizable (EM), de valores medidos *in vivo* y de producción de gas *in vitro* de 24 horas, y la composición química de los alimentos (Getachew *et al.*, 1998; Hamid *et al.*, 2007).

La estimación de la energía metabolizable, energía neta y digestibilidad de la materia orgánica *in vitro* (EM, ENL y DIVMO, respectivamente) en los alimentos fueron determinados mediante las ecuaciones propuestas por Menke y Stengass (1988), para alimentos concentrados y forrajes:

Para alimentos concentrados:

$$\text{EM (MJ kg}^{-1} \text{ MS): } 0.157 \cdot \text{GP} + 0.0084 \cdot \text{PC} + 0.022 \cdot \text{EE} - 0.0081 \cdot \text{Ce} + 1.06$$

$$\text{ENL (MJ kg}^{-1} \text{ MS): } 0.115 \cdot \text{GP} + 0.0054 \cdot \text{PC} + 0.014 \cdot \text{EE} - 0.0054 \cdot \text{Ce} - 0.36$$

$$\text{DIVMO \%: } 0.9991 \cdot \text{GP} + 0.0595 \cdot \text{PC} + 0.0181 \cdot \text{Ce} + 9$$

Para forrajes:

$$\text{EM (MJ kg}^{-1} \text{ MS): } 0.136 \cdot \text{GP} + 0.0057 \cdot \text{PC} + 0.000286 \cdot \text{EE}^2 + 2.20$$

$$\text{ENL (MJ kg}^{-1} \text{ MS): } 0.096 \cdot \text{GP} + 0.0038 \cdot \text{PC} + 0.000173 \cdot \text{EE}^2 + 0.54$$

$$\text{DIVMO \%: } 0.9042 \cdot \text{GP} + 0.0492 \cdot \text{PC} + 0.0387 \cdot \text{Ce} + 16.49$$

dónde GP es la producción de gas a 24 horas ($\text{mL } 200\text{mg}^{-1} \text{ MS}$) y PC, EE, Ce DIVMO son proteína cruda, extracto etéreo, cenizas y digestibilidad de la materia orgánica *in vitro*, respectivamente.

Krishnamoorthy *et al.* (2005) informaron que el valor energético y la tasa de fermentación de la materia orgánica calculada a partir de la fermentación *in vitro* coinciden con los valores *in vivo* para varios tipos de alimentos. Lee *et al.* (2000) mostraron una estrecha relación entre el valor energético del forraje calculado en ensayos de digestión *in vivo* y los parámetros de producción de gas *in vitro*. En consecuencia, se indicó que el valor energético de los forrajes podría estimarse rápidamente utilizando el método de gas *in vitro* para reemplazar el ensayo de digestión.

El gas acumulado, producido a diferentes tiempos de incubación, puede medirse en una muestra única y pequeña, proporcionando datos cinéticos para estimar la magnitud y la velocidad de degradación del alimento. En este contexto, el modelaje matemático es una herramienta útil para vincular los datos obtenidos *in vitro* con los procesos que se producen *in vivo* y para estimar la digestibilidad total del tracto o degradabilidad ruminal a partir de los datos cinéticos *in vitro* (López *et al.*, 2007).

2.3.3 Fracciones fermentables

Los carbohidratos son el principal componente de los forrajes, representan entre 60-80% de la biomasa de las especies forrajeras. La mayor digestión de carbohidratos (> 90%) ocurre dentro del rumen. Los azúcares simples se fermentan rápidamente dentro del rumen para producir ácidos grasos volátiles, mientras que la degradabilidad de los polisacáridos estructurales varía considerablemente. Las pectinas se degradan rápida y completamente por los microorganismos del rumen. Los polisacáridos celulolíticos y hemicelulolíticos se degradan más lenta e incompletamente. La degradabilidad de la celulosa de los forrajes varía entre 25 y 90%, mientras que la digestibilidad de la

hemicelulosa varía entre el 45 y 90%. Los valores de degradabilidad obtenidos mediante la técnica de producción de gas *in vitro* permite el estudio de la cinética de digestión de los forrajes aportando valores sobre tasas de degradación de las fracciones de carbohidratos solubles e insolubles (Moore & Hatfield, 1994; Sánchez *et al.*, 2005).

Las fracciones variables de carbohidratos fermentables en el rumen fueron estimadas en un estudio previo realizado por Miranda *et al.* (2015b), para estimar la concentración de carbohidratos de rápida, media y lenta fermentación mediante modelos de regresión que relacionaron la producción de gas *in vitro* con la concentración de carbohidratos fermentables, obteniendo alta correlación para glucosa ($R=0.7651$) y almidón ($R=0.6965$), pero baja para celulosa ($R=0.2364$), concluyendo que es factible utilizar la TPG para estimar la cantidad de glucosa y almidón, utilizando la TPG como un procedimiento simple, sensible y de bajo costo en comparación con otras técnicas. Sin embargo, hace falta elaborar más investigaciones al respecto con especies forrajeras.

2.3.4 Determinación de metano y bióxido de carbono

Actualmente, los gases de efecto invernadero (GEI) son identificados como contribuidores del calentamiento global y el metano es uno de los gases que puede contribuir con el 15-20% de todas las emisiones de los GEI. El metano proveniente de los rumiantes, representan 15% de las emisiones antropogénicas globales de gas a través de la fermentación entérica y el manejo del estiércol y es reconocido como importante contribuidor de las emisiones de los GEI (Zhong *et al.*, 2016).

Durante la digestión anaerobia, los microorganismos ruminales habitualmente convierten las principales porciones de carbohidratos y proteínas en productos finales como ácidos grasos volátiles y proteína microbiana, así como productos de desecho, principalmente metano (CH_4) y bióxido de carbono (CO_2). La tasa de emisión de metano por fermentación ruminal, está relacionada con las

características físico-químicas de la dieta (digestibilidad de la materia seca, y la concentración de fibra insoluble en detergente neutro), las cuales afectan directamente el nivel de consumo y la frecuencia de alimentación (Molina *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2012).

En los sistemas de pastoreo, donde la principal fuente de alimento es el forraje, se realizan investigaciones para determinar cómo los factores asociados a la calidad del forraje influyen en la producción de metano por los rumiantes (Vargas *et al.*, 2014).

La técnica con el trazador de hexafluoruro de azufre (SF_6), se utiliza frecuentemente para medir las emisiones de CH_4 de rumiantes en pastoreo, pero a pesar de ser muy exacta, es costosa y su aplicación representa numerosas complicaciones. Además, el SF_6 es un potentísimo GEI, con un potencial de calentamiento global 23900 veces superior al CO_2 , y con una vida media de 3200 años (Berra, Finster & Valtorta, 2009).

Aunque la producción de metano es un componente metabólico de la fermentación anaeróbica en el rumen, y representa una pérdida de energía significativa para los rumiantes, existe la posibilidad de reducir el grado de producción de metano mediante la manipulación de la dieta y las prácticas de manejo que influyen en la fermentación microbiana. Se han realizado esfuerzos considerables para explorar la posibilidad de reducir la producción de metano a partir de animales utilizando las técnicas *in vitro* (Getachew, DePeters, Robinson, & Fadel, 2005)

La concentración de metano se puede obtener mediante cromatografía de gases con muestras del gas acumulado durante las primeras 24 a 96 horas de fermentación por medio de la TPG, las cuales son recolectadas en frascos de 60 mL y llevadas a cuantificar al cromatógrafo de gases. La curva para gas metano se puede obtener por medio de inyección de diferentes volúmenes de

un estándar realizando una regresión de las áreas debajo del pico y las concentraciones (volúmenes) de gas metano inyectado (Molina *et al.*, 2013).

2.3.5 Técnica de producción de gas como un indicador en la asimilación de alimento *in vivo*

El contenido de carbohidratos en los forrajes proporciona aproximadamente 80% de la energía requerida por los rumiantes, que al ser fermentados por los microorganismos del rumen generan gases, principalmente CH₄, CO₂ y ácidos grasos volátiles, (Beuvink & Spoelstra, 1992; Moore & Hatfield, 1994).

La cantidad total de gas producido durante la fermentación *in vitro* permite una predicción precisa de la digestibilidad y el contenido de energía de los alimentos (Abaş *et al.*, 2005). Al respecto, en el experimento de Miranda *et al.* (2015c), propusieron utilizar la diferencia del Vm de gas producido del alimento ofrecido menos el de las heces para estimar la asimilación de la dieta *in vivo* en dietas con diferentes niveles de energía y proteína para ovinos, demostrando que niveles altos de energía y proteína (proporción, 15.2 %:2.8 Mcal kg⁻¹) en la dieta generan menor cantidad de gas producida por lo tanto una menor asimilación de las dietas ofrecidas, sin embargo, encontraron que al incrementar la proteína, la producción de gas disminuyó, pero al incrementar solamente la energía la producción de gas aumentó, con lo que concluyeron que ésta dieta fue menos asimilada.

Por otro lado, Vázquez (2016) analizó la asimilación de cuatro dietas para borregos y encontró que el ensilado de nopal fue asimilado mejor por los ovinos (254.5 mL g⁻¹) en comparación con ensilado de maíz (207.5 mL g⁻¹), sin ensilado (98.1 mL g⁻¹) y ensilado de nopal-tuna (170.8 mL g⁻¹), sin embargo, el Vm de la dieta ofrecida no representó el Vm de la dieta consumida, por lo que consideró calcular un índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) como una variante para determinar la cantidad de gas emitido durante el proceso de degradación del alimento consumido tomando en cuenta el Vm de

gas producido por la MS ofrecida, el Vm de gas del alimento rechazado por la MS rechazada y el Vm de gas de las heces por la MS excretada (heces) por día y por ovino. Actualmente, éste tipo de estudio no se ha investigado en animales en pastoreo, por lo que en el presente estudio se llevó a cabo para usar la TPG como indicador en la asimilación de alimento en sistemas de pastoreo.

2.4 Sistema de pastoreo mixto

El comportamiento de los animales en pastoreo está afectado por factores como el ambiente, el clima, la temperatura, las condiciones geográficas, la altura de la pastura, el tiempo de pastoreo, edad de la pastura, la densidad de pastoreo y la composición botánica de los pastos. La composición botánica afecta y se ve afectada por la selectividad de los herbívoros, que difiere entre las especies animales (Cuchillo-Hilario, Wrage-Mönnig, & Isselstein, 2017).

El empleo del pastoreo es normalmente aceptado como una práctica de producción de rumiantes de bajo costo, ya que requiere poca inversión de capital. Además, el pastoreo proporciona varios beneficios al ecosistema. El co-pastoreo de múltiples especies tiene beneficios adicionales sobre el manejo del pastoreo monoespecífico (Cuchillo *et al.*, 2017).

La ingesta de forraje por rumiantes en pastoreo afecta la composición de las comunidades de plantas en los ecosistemas de pastizales y, la extensión y el curso de sus efectos pueden depender en gran medida de las características tanto de las plantas como de los rumiantes. Liu *et al.* (2015), en un estudio de pastoreo de dos años, probaron los efectos del pastoreo con dos especies de rumiantes (ganado, ovejas y ganado con ovejas) en comunidades vegetales con altos y bajos niveles de diversidad de plantas en la estepa euroasiática oriental; los investigadores encontraron que el pastoreo mixto por ganado vacuno y ovejas aumentó significativamente la diversidad de plantas en los pastizales; mientras que el pastoreo por ganado vacuno, oveja (monoespecífico) o, por pastoreo mixto con bovinos y ovinos no afectó la biomasa vegetal en los pastos

de alta diversidad. Sin embargo, para las praderas de baja diversidad de forrajes, el pastoreo solo por el ganado y el pastoreo mixto por ganado vacuno y ovejas aumentaron la diversidad de plantas, pero disminuyeron la biomasa vegetal.

En otro estudio, Fraser *et al.* (2007), encontraron que la ganancia diaria de peso (kg ha^{-1}) en el pastoreo mixto fue 1.52 veces mayor que en el pastoreo monoespecífico y además encontraron que los sistemas de manejo que incorporan el pastoreo mixto con ganado y ovejas mejoraron la productividad ganadera y redujeron las emisiones de metano en relación con los sistemas de ovejas solamente.

En otro aspecto, el beneficio adicional en pastoreos mixtos es que se puede disminuir la carga parasitaria de parásitos gastrointestinales como nemátodos y helmintos en ovinos, en co-pastoreo con ganado bovino, y mejorar la ganancia diaria de peso de corderos post-destete (Rocha *et al.*, 2008).

2.5 Literatura citada

- Abaş, I., Özpinar, H., Kutay, H. C., Kahraman, R., & Eseceli, H. (2005). Determination of the metabolizable energy (ME) and net energy lactation (NEL) contents of some feeds in the Marmara Region by *in vitro* gas technique. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(3), 751–757.
- Aufrère, J., & Michalet-Doreau, B. (1988). Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 20(3), 203–218. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0377-8401\(88\)90044-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0377-8401(88)90044-2)
- Barahona, R., & Sánchez, S. (2005). Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Rev Corpoica*, 6(1), 69–82. https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num1_art:39
- Barchiesi-Ferrari, C., Alomar, D., & Miranda, H. (2011). Pepsin-Cellulase Digestibility of Pasture Silages: Effects of Pasture Type, Maturity Stage, and Variations in the Enzymatic Method. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(June), 249–257. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000200010>
- Baumont R., Prache, S., Meuret, M. & Morhand, F. P. (2000). How forage characteristics influence behaviour and intake in small ruminants: a review. *Livestock Prod. Sci.*, 61(1), 15-28.

- Bayona, J. V., Porras, G. M., Mashuth, J. B., Sc, M., Felipe, J., & Patiño, G. (2013). Estimación de la técnica *in vitro* de gases frente a otras técnicas de digestibilidad. *Spei Domus*, 1(c).
- Berra, G., Finster, L., & Valtorta, S. E. (2009). Una técnica sencilla para la medición de emisiones de metano entérico en vacas. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*, 8(1), 49–56.
- Beuvink, J. M., & Kogut, J. (1993). Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *Journal of Animal Science*, 71, 1041–1046. <https://doi.org/10.2527/1993.7141041x>
- Beuvink, J. M. W., & Spoelstra, S. F. (1992). Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 505–509. <https://doi.org/10.1007/BF00180978>
- Bruni, M., & Chilbroste, P. (2001). Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 9, 43–51. Retrieved from http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch_09-1/Arch_9-1-43.pdf
- Cuchillo, H. M., Wrage-Mönnig, N., & Isselstein, J. (2017). Behavioral patterns of (co-)grazing cattle and sheep on swards differing in plant diversity. *Applied Animal Behaviour Science*. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.02.009>
- De Boever, J.L., Cottyn, B.G., Buysse, F.X., Wainman, F.W. & Vanacker, J.M. (1986). The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 14, 203–214.
- Dowman, M.G. & Collins, F.G. (1982). The use of enzymes to predict the digestibility of animal feed. *J. Sci. Food Agric.* 33, 689–696.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M., Lopez, S., & Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83(2), 143-150. doi:10.1017/S0007114500000180
- France, J., Dhanoa, M. S., Theodorou, M. K., Lister, S. J., Davies, D. R., & Isac, D. (1993). A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with *In vitro* Degradation of Ruminant Feeds. *Journal of Theoretical Biology*, 163(1), 99–111. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1993.1109>
- Fraser, M. D., Davies, D. A., Vale, J. E., Hirst, W. M., & Wright, I. A. (2007). Effects on animal performance and sward composition of mixed and sequential grazing of permanent pasture by cattle and sheep. *Livestock Science*, 110(3), 251–266. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.11.006>

- Getachew, G., DePeters, E. J., Robinson, P. H., & Fadel, J. G. (2005). Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124 Pa, 547–559. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.034>
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72, 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- Giraldo, L.A., Gutierrez, L.A., Rúa, C. (2007). Comparación de dos técnicas *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 269–279. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v20n3/v20n3a05.pdf>
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service-USDA, Washington, D.C. Disponible en <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF>, consultado el 06 marzo de 2015.
- Gosselink, J. M. J., Dulphy, J. P., Poncet, C., Jailler, M., Tamminga, S., & Cone, J. W. (2004). Prediction of forage digestibility in ruminants using *in situ* and *in vitro* techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 115(3–4), 227–246. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.01.008>
- Hamid, P., Akbar, T., Hossein, J., & Ali, M. G. (2007). Nutrient Digestibility and Gas Production of Some Tropical Feeds Used in Ruminant Diets Estimated by the *in vivo* and *in vitro* Gas Production Techniques. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2(4), 108–113.
- Jones, D.I.H., & Hayward, M.V. (1975). The effect of pepsin pre-treatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *J. Sci. Food Agric.* 26, 711–718.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., & Ozay, O. (2005). Comparison of *in vitro* gas production technique with *in situ* nylon bag technique to estimate dry matter degradation. *Czech Journal of Animal Science*, 50(2), 60–67
- Khan, M. a., Mahr-Un-Nisa, & Sarwar, M. (2003). Techniques Measuring Evaluation of Feeds Digestibility for the Nutritional Evaluation of Feeds. *International Journal of Agriculture & Biology*, 5(1), 91–94.
- Krishnamoorthy, U., Rymer, C., & Robinson, P. H. (2005). The *in vitro* gas production technique: Limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124 Pa, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.015>
- Lavrenčič, A., Stefanon, B., & Susmel, P. (1997). An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal*

Science, 64(3), 423–431. <https://doi.org/DOL:10.1017/S1357729800016027>

- Lee, M.J., Hwang, S., & Wen-Shyg Chiou, P. (2000). Metabolizable energy of roughage in Taiwan. *Small Rum. Res.* 36: 251-259.
- Liu, J., Feng, C., Wang, D., Wang, L., Wilsey, B. J., & Zhong, Z. (2015). Impacts of grazing by different large herbivores in grassland depend on plant species diversity. *Journal of Applied Ecology*, 52(4), 1053–1062. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12456>
- López, S., Dhanoa, M. S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., & France, J. (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 135(1–2), 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.005>
- Makkar, H. P. S. (2002). Applications of the *in vitro* Gas Method in the Evaluation of Feed Resources, and Enhancement of Nutritional Value of Tannin-Rich Tree/Browse Leaves and Agro-Industrial By-Products. *Animal Production and Health Section, International Atomic Energy Agency*, 23–40.
- McLeod, M. N., & Minson, D. J. (1978). The accuracy of the pepsin-cellulase technique for estimating the dry matter digestibility *in vivo* of grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 3(4), 277–287. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(78\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0377-8401(78)90002-0)
- McSweeney, C. S., & Mackie, R. (2012). Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, (61), 1–62. Retrieved from www.fao.org/docrep/016/me992e/me992e.pdf
- Mehrez, A. Z., & Ørskov, E. R. (1977). A study of artificial fibre bag technique for determining the dig estibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 88(3), 645–650. <https://doi.org/DOL:10.1017/S0021859600037321>
- Meneses M., Madrid, M., Hernández, S. J. R. F., & Megias, M. D. (2000). Evaluación de diferentes métodos de conservación del líquido ruminal para pruebas *in vitro*. *Nutrición y Alimentación* 25: 315-317.
- Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28: 7-55.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1), 217–222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>

- Mertens, D. R., & Lofton, J. R. (1980). The Effect of Starch on Forage Fiber Digestion Kinetics *In vitro*. *Journal of Dairy Science*, 63(9), 1437–1446. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83101-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83101-8)
- Miranda-Romero L.A., Vázquez-Mendoza, P., Améndola-Massioti, R., Sandoval-González, L., y González- Ortiz, R. (noviembre, 2015a). Cuantificación de las fracciones fermentables de alfalfa y tuna por la técnica de producción de gas. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Puerto Varas, Chile. Hotel patagónico. p 575.
- Miranda-Romero L.A., Sandoval-González, L., y Améndola-Massioti, R. (noviembre, 2015b). Producción de gas como método para estimar *in vitro* la concentración de carbohidratos fermentables en rumen. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Puerto Varas, Chile. Hotel patagónico. p 474.
- Miranda R. L. A., Chávez, H. G., Martínez, M. L., Sánchez del Real, C., y Améndola M. R. (julio-agosto, 2015c). Asimilación de dietas por corderos estimada por la técnica de producción de gas *in vitro*. XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría. Puebla, Puebla. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A. C. p 295.
- Molina, B. I. C., Cantet, J.M., Montoya, S., Correa L.G.A., Guillermo Antonio; & Barahona, R. R. (2013). Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium* - *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(2); 15-31.
- Moore, K., & Hatfield, R. (1994). Carbohydrates and forage quality. *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*, 53706. <https://doi.org/10.2134/1994.foragequality.c6>
- Mustafa, S., Inan, G.C., Ozgur, O.A., Ihsan A., & Adile Tatliyer. (2011). Comparison of some mathematical models used in gas production technique. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(18):2465-2469.
- Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499–503. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0021859600063048>
- Peripolli, V., Prates, E. R., Barcellos, J. O. J., McManus, C. M., Wilbert, C. A., Braccini, Neto, J., Camargo, C. M., & Lopes, R. B. (2014): Models for gas production adjustment in ruminant diets containing crude glycerol. *Livestock Research for Rural Development*, 26:28. Retrieved March 21, 2016, from <http://www.lrrd.org/lrrd26/2/peri26028.htm>
- Pitt, R. E. (1999). Use of *in vitro* gas production models in ruminal kinetics, 159, 145–163.
- Posada, S. L., y Noguera, R. R. (2005) Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes.

Livestock Research for Rural Development, 17(36) Revisado el 02 de febrero de 2015, de <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>

- Rocha, A. R., Bresciani, K. D. S., Barros, T. F. M., Fernandes, L. H., Silva, M. B. and Amarante, A. F. T. (2008). Sheep and cattle grazing alternately: nematode parasitism and pasture decontamination. *Small Ruminant Research* 75: 135–143.
- Rodríguez, N., Oliveira, E., & Guimaraes, R. (2007). Uso de Indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto . LIPE, lignina purificada y enriquecida. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(35), 518–525.
- Rosero Noguera, R. (2007). Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales Comparison of mathematical models: an application for evaluation of animal food Sandra 1*. *Rev Col Cienc Pec*, 20, 141–148.
- Sánchez, D. E., Arreaza, L. C., & Abadía, B. (2005). Estudio de la cinética de degradación *in vitro* de cuatro forrajes tropicales y una leguminosa de clima templado. *Corpoica*.
- Schofield, P., Pitt, R. E. & Pell, A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science*, 72: 2980-2991.
- Seifried, N., Steingäß, H., & Rodehutschord, M. (2015). *In vitro* and in situ evaluation of secondary starch particle losses from nylon bags during the incubation of different cereal grains. *Animal Feed Science and Technology*, 210, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.011>
- Singh, S., Kushwaha, B. P., Nag, S. K., Mishra, A. K., Singh, A., & Anele, U. Y. (2012). *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*, 178(1–2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.08.019>
- Tilley, J. M. & Terry, R. A. (1963). A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18: 104-111.
- Velho, J. P., Frenzel, M.P.R., Moraes, G. T.C., Jardim, B. J. O., Neto, J. B., & Suñé M. R. (2014). Mathematical models for adjustment of *in vitro* gas production at different incubation times and kinetics of corn silages. *Semina: Ciencias Agrarias*, 35(4), 2531–2540. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2531>
- Vargas-Bayoma, J., Mejía-Porras, G., Bedoya-Mashuth, J., & Gómez-Patiño, J. F. (2014). Estimación de la técnica *in vitro* frente a otras técnicas de digestibilidad. Artículo de revisión. *Spei Domus*, 9:18.
- Vázquez, P. (2016). Aprovechamiento del nopal y tuna en la alimentación de ovinos. Tesis Doctoral. Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. 51-52 p. Disponible en https://chapingo.mx/produccionanimal/administrador/components/com_jre

search/files/publications/Res_tesis_P_Vazquez_Mendoza.pdf, consultado el 15 de abril de 2017.

- Williams B., A. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E (editors). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.
- Zhong, R. Z., Fang, Y., Sun, H. X., Wang, M., & Zhou, D. W. (2016). Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(2), 414–423. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61036-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61036-X)

3 CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES Y FERMENTATIVAS DE PRADERAS ALFALFA-OVILLO EN PASTOREO MIXTO Y MONOESPECÍFICO

3.1 Resumen

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la edad de praderas compuestas por alfalfa-ovillo con dos sistemas de pastoreo, mixto (Pmx) de vacas con borregas, y monoespecífico (Pmn) de vacas, sobre la composición botánica y nutricional, digestibilidad y fermentación ruminal *in vitro*. El pastoreo fue rotacional intensivo con un promedio de utilización de tres días y 32 días de descanso. Se utilizó un diseño de parcelas divididas. La parcela mayor fue la edad de la pradera con seis repeticiones y la parcela menor, el tipo de pastoreo con dos repeticiones. La masa de forraje fue afectada por el pastoreo, 1.4 veces mayor en Pmn que en Pmx ($p<0.001$); la edad de la pradera y el sistema de pastoreo influyeron en la proporción de alfalfa ($p<0.05$) mayor para Pmx en praderas jóvenes, la proporción de pasto ovillo fue mayor para Pmx ($p<0.05$). La digestibilidad de la materia orgánica (DIVMO) fue de 76% y 66% para praderas jóvenes y maduras, respectivamente ($p<0.05$). Los componentes químicos y fermentativos no tuvieron efecto por edad de la pradera y el sistema de pastoreo. Finalmente, a pesar de que no se presentaron cambios significativos en las características nutritivas y fermentativas por efecto de pastoreo, el manejo de dos especies puede afectar la masa de forraje y la composición botánica.

Palabras clave: pastoreo mixto, pastoreo monoespecífico, edad, masa de forraje, composición química, digestibilidad de la materia orgánica.

3 NUTRITIVE AND FERMENTATIVE CHARACTERISTICS OF ALFALFA-ORCHARD PASTURE UNDER MIXED AND MONOSPECIFIC GRAZING

3.2 Abstract

The aim of this study was to determine the effect of age of alfalfa and orchard grassland and two grazing systems, mixed (Pmx) cattle grazing with ewe lambs, and single species grazing with cows (Pmn) on botanical and chemical composition, digestibility and rumen fermentation in vitro. Grazing was rotational intensive with an average of three grazing days and 32 days resting. The experiment was carried out in a randomized block design with a split plot arrangement where pasture ages were whole plots with six replicates and grazing systems were split plots. Herbage mass was affected by grazing system, being 1.4 times higher in Pmn than in Pmx ($p < 0.001$); the age of grasslands and grazing systems influenced on alfalfa ($p < 0.05$) it was higher on Pmx on younger grasslands; the proportion of clover grass was higher on Pmx ($p < 0.05$). The digestibility of organic matter (DIVMO) was 76% and 66% for young and mature grasslands, respectively. The chemical and fermentative components had no effect on age and grazing. Although there were no significant changes in the nutritive and fermentative characteristics due to grazing systems, the management of two species can affect herbage mass and the botanical composition.

Keywords: mixed grazing, monospecific grazing, age, forage mass, chemical composition, digestibility of organic matter.

3.3 Introducción

Los recursos forrajeros son parte fundamental en la nutrición de rumiantes y proveen aproximadamente 80% de la energía consumida por éstos (Barahona & Sánchez, 2005). El potencial de los recursos forrajeros para la producción animal depende de su digestibilidad y del consumo voluntario de estos forrajes por los rumiantes (Bruinenberg *et al.*, 2000). La especie forrajera, edad, cosecha, ambiente, prácticas de manejo animal son factores que pueden modificar el valor nutritivo del forraje (Shaver *et al.*, 2002). La composición química y las pruebas de digestibilidad permiten estimar la proporción de nutrientes presentes en una ración que pueden ser absorbidos por el aparato digestivo (Lachmann & Araujo, 1999). Buxton (1996), menciona que el retraso de una semana en la recolección de alfalfa (*Medicago sativa* L.) disminuirá la digestibilidad y la concentración de proteína bruta en 20 g kg^{-1} y aumentará la concentración de la pared celular en aproximadamente 30 g kg^{-1} . Por otro lado, el recurso forrajero se puede complementar mejor si la pradera contiene más de una especie vegetativa en un pastoreo mixto, debido a la preferencia del forraje seleccionado por cada especie, dando como resultado una cantidad de masa forrajera más homogénea (Wright, Jones & Parsons, 2001). En relación a la selección del forraje por los animales, el tipo de pastoreo puede influir en las características botánicas del forraje. Nicol *et al.* (2001), encontraron que la cantidad de trébol rechazado fue mayor para el pastoreo monoespecífico de vacas (13.5%) comparado con el pastoreo mixto con ovejas (9.5 %). La calidad nutritiva del forraje seleccionado también se ve influenciada por el tipo de pastoreo. Al respecto, González *et al.* (2003), encontraron que el contenido de DIMS, PC y FDN, fueron de 75, 21 y 41% respectivamente, en el forraje seleccionado por vacas, y 77.5, 23.2 y 37.6% respectivamente, para el consumo de borregas en pastoreo mixto. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la edad de la pradera y el sistema de pastoreo en la calidad nutritiva y fermentativa de las praderas.

3.4 Materiales y métodos

El experimento se realizó en el Módulo de Leche en Pastoreo y en el laboratorio de Microbiología Pecuaria de la Universidad Autónoma Chapingo. El área de estudio se ubica sobre las coordenadas 19°29' N, 98° 54' O y altitud de 2240 msnm el clima es templado subhúmedo, con lluvias en verano y precipitación y temperatura media anual de 636.5 mm y 15.2 °C, respectivamente (García, 1988).

Previo al muestreo de forraje, cuatro praderas de 12,000 m² cada una, de uno, dos, tres y cuatro años de edad, las cuales estuvieron compuestas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.), fueron divididas en tres lotes de 4,000 m². En cada lote se integraron dos sistemas de pastoreo intensivo rotacional: monoespecífico (cinco vacas Holstein Neozelandés en producción de 522 ± 77 kg) y mixto (cinco vacas Hostein Neozelandés y 18 borregas Pelibuey de 45 ± 4 kg), replicado, con periodos de ocupación promedio de 3 días y periodos de descanso de 32 días. El área total de trabajo fue de 4.8 ha. Para la asignación diaria de forraje, se consideró: a) el peso de las vacas, b) un consumo absoluto de 3.2 kg MS 100 kg PV⁻¹ d⁻¹, c) la materia seca del suplemento y, d) la eficiencia de las cosechas del forraje por encima de 5 cm de altura de 70 %.

El manejo animal: las vacas se ordeñaron diariamente en dos horarios: 6:30 y 15:30 h. Después de la ordeña cada vaca recibió 3.6 kg MS de concentrado y 4.3 kg MS de heno de alfalfa. El resto del día, las vacas permanecieron en el área de pastoreo. Las borregas estuvieron en el área de pastoreo entre las 8:00 y 18:00, el resto del tiempo permanecieron en un corral con agua limpia y fresca *ad libitum*.

Posterior al primer ciclo de pastoreo, se procedió a realizar el muestreo del rebrote de forraje en las praderas, durante la época de verano (agosto-septiembre, 2015). Para estimar la cantidad de masa de forraje, se hizo cuatro cortes en franjas de 0.52 m x 8 ± 1.8 m, con una podadora marca Trupper® P-

520 a una altura de 5 cm, la masa forrajera presente por debajo de los 5 cm se cosechó con tijeras a ras de suelo. Para determinar la composición botánica, se procedió a seleccionar al azar cuatro sitios de 0.25 m² dentro del lote, para lo cual se usó un cuadrado metálico de 0.5 x 0.5 m. Las muestras de forraje, se secaron en una estufa de circulación forzada de aire, a 55°C por 48 h, se molieron en un molino (Wiley® 4) con criba de 1 mm, y se almacenaron para su análisis químico y fermentativo.

Tratamientos: los tratamientos fueron resultado de dos sistemas de pastoreo: monoespecífico (Pmn) y mixto (Pmx), y dos edades de praderas: jóvenes (uno y dos años) y maduras (tres y cuatro años), con tres repeticiones por tratamiento y dos dentro de lote (3x2). Los lotes fueron asignados al azar a grupos de vacas según el sistema de pastoreo (Pmn o Pmx).

Las variables se agruparon en: masa de forraje, composición botánica y química, digestibilidad y fermentación ruminal *in vitro*. Para la composición botánica, las muestras total de forraje fresco se pesaron e inmediatamente después se separaron en tres componentes: alfalfa, pasto ovillo y otros (maleza y pastos no sembrados), los cuales fueron secado en estufa a 65 °C por 48 h y se pesaron para determinar la materia seca. La proporción de cada componente se expresó en porcentaje base seca.

Composición química: las muestras de forraje seco de cada pradera se usó para cuantificar el contenido de proteína cruda, cenizas, extracto etéreo, y extracto libre de nitrógeno (AOAC, 1990); fibras insolubles en detergentes ácido y neutro (Georing & Van Soest, 1970), con un ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer USA.

Digestibilidad y fermentación ruminal *in vitro*: se determinó indirectamente por la técnica de producción de gas (Menke & Steigass, 1988). En frascos de 125 mL de capacidad, se adicionaron 500 mg MS de forraje, 90 mL de inóculo ruminal diluido (1:10) en una solución mineral reducida, y un flujo continuo de CO₂. Los frascos se cerraron herméticamente con un tapón de goma y un aro

de aluminio y se incubaron a 39°C en un baño maría por 72 h. El volumen de gas de fermentación se midió a las 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60, y 72 horas de incubación. Al término de la incubación, el residuo de sustrato fermentado fue filtrado en papel a peso constante, secado a 65°C por 48 h en estufa y pesado, para determinar la materia seca residual.

El inóculo ruminal se obtuvo mediante una sonda de plástico de cinco ovejas en pastoreo de las unidades experimentales. Cada litro de solución mineral reducida contenía Na₂CO₃ (0.6 g), K₂HPO₄ (0.45 g), KH₂PO₄ (0.45 g), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g), NaCl (0.9 g), MgSO₄ (0.18 g), CaCl₂ (0.12 g), Na₂S (0.25 g), L-Cisteína (0.25 g) y una gota de resarzurina (0.1%).

Con el volumen de gas se obtuvieron el volumen máximo (Vm; mL g⁻¹), tasa (S; h⁻¹) y tiempo de retardo (L; h) del modelo logístico $V_0 = V_m / (1 + \exp^{(2.4 * s * (T - L))})$ (Schofield, Pitt & Pell, 1994), mediante el procedimiento NLIN de SAS. Además, se obtuvieron los volúmenes fraccionales de gas para los intervalos de 0 a 8 (Vf₀₋₈); 8 a 24 (Vf₈₋₂₄) y 24 a 72 (Vf₂₄₋₇₂) horas de incubación. Posteriormente fueron transformados a fracciones de rápida (FR), media (FM) y lenta fermentación (FL) de acuerdo con los modelos Vf₀₋₈=0.4266*(mg FR); Vf₈₋₂₄=0.6152*(mg FM), y Vf₂₄₋₇₂= 0.3453*(mg FL) (Miranda-Romero *et al.*, 2015). La fracción fermentable total (FT) se obtuvo mediante la suma de las tres fracciones anteriores.

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y de la materia orgánica (DIVMO), se determinó calculando el porcentaje de la MS o MO digeridas. Estas últimas se obtuvieron por diferencia de la MS o MO inicial menos MS o MO residual.

Análisis estadístico: se utilizó el procedimiento Proc Mixed de SAS 9.3 y el modelo estadístico que incluyó los efectos fijos de pastoreo, pradera,

interacción pastoreo*pradera y, los efectos aleatorios de repetición dentro de la interacción pastoreo*pradera (Ecuación 1).

$$Y_{ijk} = \mu + \text{pastoreo}_i + \text{pradera}_j + \text{pastoreo} * \text{pradera}_{ij} + \text{aleatorio repetición}(\text{pastoreo} * \text{pradera}) + e_{ijk} \quad (1)$$

Donde:

Y_{ijk} = forraje, alfalfa, ovillo, otros, PC, FDN, FDA, Ce, EE, Vm, S, L, FR, FM, FL, FT, DIVMS, DIVMO.

pastoreo_i = Pmx, Pmn.

pradera_j = jóvenes y maduras

3.5 Resultados y discusión

En el Cuadro 2 se muestra la cantidad de forraje (kg ha^{-1}) producido por efecto del sistema de pastoreo y la edad de la pradera. No hubo efecto ($P > 0.05$) de edad de la pradera ni de la interacción pradera*pastoreo. El pastoreo monoespecífico indujo 1.4 veces más ($P < 0.0001$) forraje que cuando se usa pastoreo mixto. Mendiola-González *et al.* (2007), encontraron un comportamiento similar en cuanto a masa de forraje producido en praderas de alfalfa-ovillo con pastoreo mixto o monoespecífico de becerras y borregas. Contrario a lo reportado por Jiménez-Rosales *et al.* (2014), donde la masa de forraje fue mayor para el Pmx con 18% ($P < 0.01$).

La interacción pastoreo*pradera solo afectó la proporción de alfalfa ($P < 0.05$) (Figura 1). La interacción indica que la proporción de alfalfa es mayor en praderas jóvenes que maduras, pero cuando se aplica un pastoreo mixto éste induce una menor proporción de alfalfa al usar praderas maduras, y una mayor proporción cuando se pastorean praderas jóvenes.

El efecto de la edad de la pradera y el sistema de pastoreo en su composición botánica se muestran en el Cuadro 2. Las praderas jóvenes tuvieron mayor

($P < 0.05$) proporción de alfalfa que las praderas maduras (40.5 vs 12.3%), en concordancia con pastos no sembrados y maleza (otros), en los que en las praderas jóvenes es menor con relación a las maduras (39.9 vs 69.3%). La proporción del pasto ovillo fue similar para ambas edades de praderas ($P > 0.05$).

Cuadro 2. Cantidad y composición botánica del forraje de praderas jóvenes y maduras de alfalfa-ovillo después de ser pastoreadas en sistema mixto o monoespecífico.

Sistema de pastoreo	Masa de forraje kg ha ⁻¹	Alfalfa	Ovillo	Otros [‡]
		----- % -----		
Monoespecífico	2596±162	25.6±5.6	16.5±2.6	58.0±6.2
Mixto	1883±158	27.1±5.6	21.8±2.5	51.0±6.1
<i>p</i>	***	ns	*	*
Pradera ^b				
Joven	2298±209	40.5±7.8	19.6±3.2	39.9±8.5
Madura	2181±210	12.3±7.8	18.6±3.2	69.3±8.5
<i>p</i>	ns	*	ns	*
<i>p</i> Pastoreo*Pradera	ns	*	ns	ns

^b jóvenes (uno y dos años), maduras (tres y cuatro años)

[‡] Maleza y pastos no sembrados, diferentes al ovillo.

p = probabilidad; ns, no significativo; * $p < 0.05$.

Respecto al sistema de pastoreo, éste no afectó la proporción de alfalfa ($P > 0.05$) pero sí la de pasto ovillo y otros ($P < 0.05$). El pastoreo mixto promueve mayor ($P < 0.05$) crecimiento de pasto ovillo y reduce ($P < 0.05$) la maleza y pasto no sembrado (Cuadro 2). Jiménez-Rosales *et al.* (2014), también encontraron efectos ($P < 0.0001$) del Pmx en la proporción de alfalfa y del Pmn en la del pasto ovillo; sin embargo fue diferente a la presente investigación respecto a la maleza ya que no se encontró efecto ($P > 0.05$). Esta diferencia puede atribuirse a que en la presente investigación se encontró pastos no sembrados diferentes de ovillo, junto con la maleza y material muerto. Sanderson *et al.* (2005)

encontraron una proporción mayor de pastos no sembrados (*Elytrigia repens* Nevski.) y malezas (46%), en praderas sembradas con pasto ovillo y trébol blanco y pastoreadas por vacas lecheras, respecto de praderas con mayor número de especies sembradas.

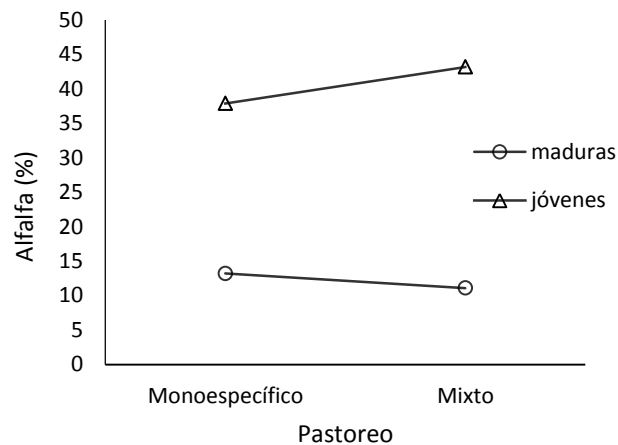


Figura 1. Proporción de alfalfa en praderas jóvenes y maduras de alfalfa-ovillo, después de ser pastoreadas en un sistema mixto o monoespecífico.

Mixto, cinco vacas Holstein Neozelandés más 18 borregas; monoespecífico, cinco vacas Holstein Neozelandés. Jóvenes, uno y dos años; maduras, tres y cuatro años.

Las leguminosas como la alfalfa y el trébol blanco en praderas mixtas pueden presentar un desarrollo inconsistente y pueden ser más sensibles al manejo con pastos, pero también el suelo y clima pueden afectar la proporción de las leguminosas durante el tiempo, en praderas mixtas (Frasser *et al.*, 2007).

Respecto a los componentes nutritivos del forraje, el contenido de cenizas fue afectado ($P < 0.05$) por la interacción pradera*pastoreo como se muestra en la Figura 2. Se observó que la proporción de cenizas fue mayor en praderas maduras respecto a las jóvenes. Sin embargo, el pastoreo mixto indujo una disminución en el contenido de cenizas en las praderas maduras y un incremento en las praderas jóvenes. Los contenidos de PC, EE, FDN y FDA

(Cuadro 3), no fueron afectados por la edad de la pradera o sistema de pastoreo y tampoco hubo interacción de estos factores ($P>0.05$).

Cuadro 3. Proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), cenizas (Ce), fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA) de forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.

	PC	EE	Ce	FDN	FDA
	----- % -----				
Pastoreo					
Mono	17.4±0.7	1.7±.08	13.6±0.4	52.2±1.7	27.3±0.9
Mixto	17.7±0.7	1.6±.07	14.9±0.4	50.2±1.6	26.8±0.8
<i>p</i>	ns	ns	*	ns	ns
Pradera ^b					
Joven	18.4±0.9	1.8±.09	14.0±0.5	50.0±2.0	28.4±1.0
Madura	16.6±0.9	1.6±.09	14.5±0.5	52.5±2.0	25.8±1.0
<i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns
<i>p</i> Pastoreo*Pradera	ns	ns	**	ns	ns

^b jóvenes (uno y dos años), maduras (tres y cuatro años)

p = probabilidad; ns, no significativo; * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

González *et al.* (2003) tampoco encontraron diferencia ($P>0.05$) en el contenido de PC y FDN en forrajes, cuando se pastoreo las praderas con vaquillas y borregas, respecto al pastoreo monoespecífico de borregas o vaquillas. Abaye *et al.* (1994) encontraron que la calidad nutritiva (PC, FDN y FDA) del forraje donde pastaron vacas con borregas, fue intermedia con respecto a la calidad de praderas pastoreadas con borregas o vacas, sin embargo, los investigadores observaron menores concentraciones de PC y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) en los meses de julio y septiembre.

Con relación a la variable de fermentación y digestibilidad (Cuadro 4), no se encontró interacción pradera*pastoreo ($P>0.05$) para ninguna de las variables determinadas (Vm, S, L, DIVMS y DIVMO). El sistema de pastoreo tampoco afectó ($P>0.05$) dichas variables, pero las DIVMS y DIVMO variaron ($P<0.05$) de acuerdo a la edad de la pradera. Las praderas jóvenes se digieren menos que las praderas maduras; sin embargo no se modifican ($P>0.05$) los parámetros de fermentación.

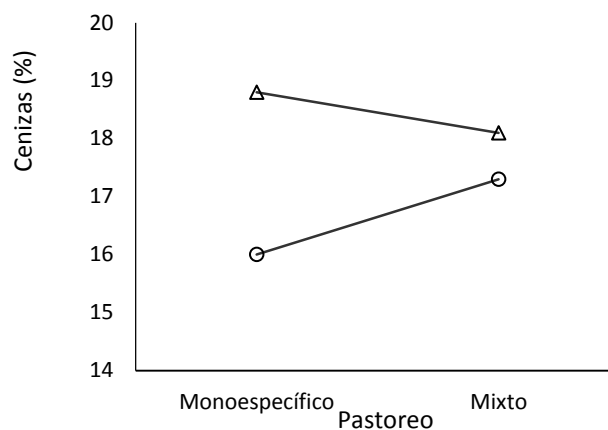


Figura 2. Proporción de cenizas en forraje de praderas jóvenes y maduras de alfalfa-ovillo, en pastoreo mixto (Pmx) o monoespecífico (Pmn). Jóvenes, uno y dos años; maduras, tres y cuatro años. Pmx, cinco vacas Holstein Neozelandés más 18 borregos; Pmn, cinco vacas Holstein Neozelandés.

Estos resultados difieren de los de Buxton, (1996) que mencionó una alta correlación entre la edad del forraje y la digestibilidad, debido a un cambio en la proporción de hojas, donde las leguminosas cambian de hoja ligeramente con el tiempo, mientras que las hojas de gramíneas disminuye más notablemente. Sin embargo, la disminución de hojas de gramíneas es más lenta que las de vainas foliares o tallos, y da como resultado una disminución más rápida en la digestibilidad de gramíneas perennes por la edad y la madurez que de las leguminosas.

Por otro lado, Fick y Onstad (1988), indican que para la alfalfa de 35 días de edad la tasa de aumento en la concentración de FDN es de $3.8 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, y que el retraso de unos pocos días en la cosecha de alfalfa puede reducir notablemente la calidad de la leguminosa. El retraso de la cosecha en una semana puede disminuir la digestibilidad y la concentración de proteína bruta en unos 20 g kg^{-1} y aumentar la concentración de FDN en 30 g kg^{-1} .

Cuadro 4. Variables de producción de gas y digestibilidades *in vitro* de la MS y MO del forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.

	Variables de producción de gas			Digestibilidad	
	Vm	S	L	MS	MO
	mL g ⁻¹	h ⁻¹	h	----- % -----	
Sistema					
pastoreo					
Mono	264±1.0	.022±.001	4.9±0.83	59±2.0	69±1.9
Mixto	265±9.7	.024±.001	5.6±0.82	60±1.9	72±1.8
<i>p</i>	ns	ns	ns	ns	ns
Edad pradera ^p					
Joven	268±13	.023±.001	3.7±1.1	57±2.0	66±2.2
Madura	261±13	.024±.001	6.8±1.0	63.2±2.0	76±2.2
<i>p</i>	ns	ns	ns	*	**
<i>p</i> Sistema*edad	ns	ns	ns	ns	ns

^p joven (uno y dos años), madura (tres y cuatro años)

Vm=Volumen máximo de gas de fermentación *in vitro*, S=taza de fermentación, L=tiempo lag, MS=materia seca, MO=materia orgánica.

p = probabilidad; ns, no significativo; **p*<0.05.

La mayor digestibilidad de praderas maduras con respecto a las jóvenes en éste estudio pudo deberse a la proporción de alfalfa-ovillo con respecto a malezas y pasto no sembrado. Al respecto, Molina *et al.* (2013) encontraron que la digestibilidad de las gramíneas es menor (48%), con respecto al de leguminosas (55.9%) en forrajes tropicales, pero las proporciones entre

gramínea-leguminosa lograron cambiar la digestibilidad en un 42.9, 45 y 49.6% para 90-10, 80-20, 70-30, respectivamente, la proporción gramínea-leguminosa.

Para las fracciones fermentables (Cuadro 5), tampoco se encontró interacción pradera*pastoreo para ninguna de las variables determinadas. Las fracciones fermentables de las praderas fueron iguales, independientemente el tipo de pradera o el tipo de pastoreo llevado a cabo.

Cuadro 5. Fracciones fermentables del forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades

	FR (Vm ₀₋₈)	FM (Vm ₈₋₂₄)	FL(Vm ₂₄₋₇₂)	FT
	----- mL g ⁻¹ -----			
Pastoreo				
Mono	105±10	118±14	420±10	642±24
Mixto	101±9	120±14	427±9	658±23
<i>p</i>	ns	ns	ns	ns
Pradera ^p				
Joven	102 ±13	119±20	416±10	636±30
Madura	103±13	120±20	430±11	653±30
<i>p</i>	ns	ns	ns	ns
<i>p</i> Pastoreo*Pradera	ns	ns	ns	ns

^p jóvenes (uno y dos años), maduras (tres y cuatro años)

FR, FM, FL= fracciones de rápida, mediana y lenta fermentación, que corresponden al volumen de gas producido en los periodos de 0-8, 8-24 y 24 a 72 h de incubación. FT=fracción total (suma de FR; FM, y FL).

p = probabilidad; ns, no significativo.

3.6 Conclusiones

Las características nutritivas y fermentativas de la pradera de alfalfa-ovillo se mantienen constantes en los sistemas de pastoreo mixto y monoespecífico. La edad de la pradera, determina el aporte de alfalfa y la presencia de especies espontáneas, el efecto de la edad de la pradera sobre el aporte de alfalfa es dependiente del sistema de pastoreo.

El sistema de pastoreo aun cuando no es un factor que implique cambios en características nutritivas y fermentativas, si puede marcar diferencia en la cantidad de masa de forraje presente.

3.7 Literatura citada

- Abaye, A. O., Allen, V. G., & Fontenot, J. P. (1994). Influence of grazing cattle and sheep together and separately on animal performance and forage quality. *Journal of Animal Science*, 72, 1013–1022.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Agricultural Chemists, Washington, DC. 2000 p.
- Barahona, R., & Sánchez, S. (2005). Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Rev Corpoica*, 6(1), 69–82. https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num1_art:39.
- Bruinenberg, M. H., Valk, H., Korevaar, H. & Struik P. C. (2000). Factors affecting digestibility of temperate forages from semi natural grasslands: a review. *Grass and Forage Science*, 57: 292–301.
- Buxton, D.R. (1996). Quality-related characteristics of forage as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science Technology*, 59:37–49.
- Fick, G.W. & Onstad, D.W. (1988). Statistical models for predicting alfalfa herbage quality from morphological or weather data. *J. Prod. Agric.*, 1: 160- 166.
- Fraser, M. D., Davies, D. A., Vale, J. E., Hirst, W. M., & Wright, I. A. (2007). Effects on animal performance and sward composition of mixed and sequential grazing of permanent pasture by cattle and sheep. *Livestock Science*, 110(3), 251–266. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.11.006>.
- García, E. (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana). 4a. ed., Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 217 p.
- Georing, H. K., & P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus Reagents, Procedures, and Some Applications). Agricultural Handbook No 379. ARS-USDA, Washington, DC. 90 p.
- González, S. J. C., Améndola, R. D., Martínez, P. A. & Burgueño, J. A. (2003). Pastoreo de borregos y vaquillas. Curso de Alimentación en Ovinos, Organizado por Asoc. Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinicultura, Fac. de Med. Veterinaria y Zootecnia de la UAEM, Colegio de Med. Veterinarios Zootenistas del Estado de Hidalgo y la Secretaría de Agricultura del Estado de Hidalgo-México, Pachuca, Hidalgo, México, 24 y 25/04/2003. Disponible en <http://www.produccion->

animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pastoreo%20sistemas/135-Pastoreo_Mixto.pdf, consultado el 22 de enero de 2017.

- Jiménez-Rosales, J.D., Améndola Massiotti, R.D., Vázquez-Hernández, I., Huert-Bravo, M., Burgueño-Ferreira, J.A., & Topete-Pelayo, P. (2014). Pastoreo de vacas lecheras con borregas de cría como seguidoras de alfalfa-orchard. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17: 289 – 293.
- Lachmann, M., & Febres, O. (1999). La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes. *Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias* Disponible en <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/Digestibilidadderumiantes.pdf>, consultado el 5 diciembre de 2016.
- Mendiola-González, A., Martínez-Hernández, P.A., Cortés-Díaz, E., y Sánchez-el-Real, C. (2007). Efecto del pastoreo mixto y monoespecífico en una pradera de alfalfa-ovillo. *Agriciencia* 41:395-403.
- Menke, K. H., & H. Steingass. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*. 28: 7-55.
- Miranda-Romero L.A., Sandoval-González, L., y Améndola-Massioti, R. (noviembre, 2015). Producción de gas como método para estimar *in vitro* la concentración de carbohidratos fermentables en rumen. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Puerto Varas, Chile. Hotel patagónico. p 474.
- Molina, B. I. C., Cantet, J.M., Montoya, S., Correa L.G.A., Guillermo Antonio; & Barahona, R. R. (2013). Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium* - *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(2); 15-31.
- Nicol, A.M., Griffiths, W.M., & Edwards, G.R. (2007). Integrated Livestock Management. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, Vol. 67.
- Sanderson, M. A., Soder, K. J., Muller, L. D., Klement, K. D., Skinner, R. H., & Goslee, S. C. (2005). Forage mixture productivity and botanical composition in pastures grazed by dairy cattle. *Agronomy Journal*, 97(5), 1465–1471. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0032>.
- Schofield, P., Pitt, R. E. & Pell, A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.
- Shaver, R.D., Undersander, D.J., Schwab, E.C., Hoffman, P.C., Lauer, J., Combs, D.K., & Hoffman, P.C. (2002). Evaluating forage quality for lactating dairy cows. In Proc. Inter-Mountain Nutr. Conf., Salt Lake City, Utah. pp. 77-94.
- Wright, I.A., Jones, J.R., & Parsons, A.J. (2001). Effects of grazing by sheep or cattle on sward structure and subsequent performance of weaned lambs. *Grass and Forage Science* 56: 138-150.

4 EDAD DE PRADERAS Y SISTEMA DE PASTOREO SOBRE ASIMILACIÓN DE FORRAJE ESTIMADA POR PRODUCCIÓN DE GAS

4.1 Resumen

El objetivo del presente estudio fue generar información sobre la aplicación de la técnica de producción de gas (TPG) para el estudio de la asimilación de dietas para rumiantes en pastoreo. Con tal fin, se determinaron el consumo aparente, la digestibilidad aparente, la asimilación de la dieta y el índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) de praderas de alfalfa-ovillo de dos edades (jóvenes y maduras) con dos sistemas de pastoreo, mixto (Pmx, vacas lecheras en producción con borregas de cría) y monoespecífico (Pmn, vacas lecheras). Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo en parcelas divididas en el que la parcela mayor fue la edad de la pradera con seis repeticiones y la parcela menor, el sistema de pastoreo con dos repeticiones. Diariamente se proporcionó 7.9 kg vaca⁻¹ de alimento suplementario. Se tomaron muestras de forraje ofrecido y residual para determinar: masa de forraje (kg ha⁻¹), volumen máximo (Vm; mL g⁻¹), tasa (S; h⁻¹) y fase lag (L, h) de la fermentación *in vitro*. También se tomaron muestras de forraje residual y heces para calcular la digestibilidad aparente de materia seca, y su Vm. La asimilación (ASIVm; mL g⁻¹) de la pradera y el índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF; hL lote⁻¹ d⁻¹), se estimaron como: ASIVm=VmAT-Vmheces; IEPGF=(VmAT*kg MS AT) – (Vmheces*kg MS heces), donde AT=forraje+suplemento. El consumo aparente de la MO y la asimilación de la dieta no fueron afectados (p<0.05) por el sistema de pastoreo y la edad de la pradera. La digestibilidad de la materia seca fue 5% mayor con Pmn y 19% mayor en praderas maduras. El IEPGF fue mayor con el Pmx (p<0.01), lo que indicó que hubo mayor asimilación por fermentación en Pmx e impacto al ambiente. La TPG ofrece información útil para caracterizar sistemas de pastoreo.

Palabras clave: fermentación *in vitro*, pastoreo mixto, edad de pradera, asimilación, impacto ambiental.

4 AGE OF PASTURES AND GRAZING SYSTEM ON HERBAGE ASSIMILATION ESTIMATED BY GAS PRODUCTION

4.2 Abstract

The study was aimed at producing information on the use of the gas production technique (GPT) in the study of assimilation of grazing ruminants diets; to achieve that objective, an experiment was carried out on alfalfa and orchard grass pastures of different age (young and mature), with two grazing systems, mixed grazing of dairy cows with breeding ewes (Pmx), and single species grazing with dairy cows (Pmn). Response variables were, apparent feed intake, apparent digestibility, assimilation of the diet and the index of potential emission of fermentation gases (IPEFG). The experiment was carried out in a randomized block design with a split plot arrangement where pasture ages were whole plots with six replicates and grazing systems were split plots. Cows received daily 7.9 kg cow⁻¹ of supplementary feed. Samples were taken of herbage on offer and residual herbage, in order to measure herbage mass (kg ha⁻¹), herbage gas production (Vm; mL g⁻¹), fermentation rate (S, h⁻¹) and lag phase (L, h) using an *in vitro* fermentation technique. Samples of residual herbage and feces-Cr₂O₃ in order to calculate apparent dry matter digestibility, and its Vm. Herbage assimilation (ASIVm; mL g⁻¹) and IPEFG (hL experimental unit⁻¹ d⁻¹) were estimated as ASIVm=VmAT-Vmfeces; IPEFG =(VmAT*kg MS AT) – (Vmfeces*kg MS feces), where AT=herbage+supplementary feed. Organic matter apparent intake and diet assimilation were not affected (p>0.05) by grazing system or age of pastures. Dry matter digestibility was 5% higher in Pmn and 19% higher in mature pastures. The IPEFG was higher in Pmx (p<0.01), which means higher assimilation through fermentation and higher environmental impact. The gas production technique produces information valuable for the characterization of grazing systems.

Key words: *in vitro* fermentation, mixed grazing, age of grassland, assimilation, environmental impact.

4.3 Introducción

El valor nutritivo de los forrajes comprende el nivel de consumo, contenido de nutrientes y digestibilidad (Giraldo, Gutiérrez & Rúa, 2017). La especie y variedad de forraje, madurez a la cosecha, corte, ambiente, prácticas de producción animal son factores que pueden modificar el valor nutritivo del forraje, los cuales inciden los costos de alimentación y el comportamiento productivo animal (NRC, 2001; Shaver *et al.*, 2002). La proporción de nutrientes digeridos y absorbidos en el tracto digestivo se le conoce como digestibilidad aparente *in vivo*, la cual puede determinarse por diversas técnicas de campo y laboratorio (Giraldo, L.A., Gutierrez, L.A., & Rúa, 2007).

La determinación de la digestibilidad aparente en sistemas pastoriles se complica debido a la necesidad de conocer la cantidad total de heces excretadas, por lo que se han usado la inclusión de marcadores internos y/o externos (como el óxido de cromo) en dietas, para estimar la cantidad de heces a partir de una muestra representativa de las mismas (Rodríguez *et al.*, 2007).

La técnica de producción de gas (TPG) es una técnica que predice no solo la digestibilidad *in vitro*, simulando la fermentación ruminal de los alimentos, sino también las fracciones fermentables solubles e insolubles de los alimentos a la vez que proporcionan información sobre la dinámica de la fermentación del forraje (Khan *et al.*, 2003). Se han comparado datos obtenidos de diversas investigaciones *in vitro* con los de experimento *in situ* e *in vivo*, donde han encontrado una correlación alta entre la producción de gas a las 24h y la digestibilidad *in vivo* de la MO; recientemente se investiga la aplicación de la TPG como un indicador en la asimilación de la dieta *in vivo* y en la cuantificación de las fracciones fermentables de los alimentos (Miranda *et al.*, 2015a; Miranda *et al.*, 2015b; Vázquez, 2016); sin embargo, no hay investigaciones enfocadas al uso de esta técnica como indicador de la asimilación *in vivo* en sistemas pastoriles, por lo tanto el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto del tipo de pradera (jóvenes y maduras) y pastoreo (mixto y monoespecífico) en la asimilación de la dieta, comparando la

digestibilidad aparente y las variables estimadas por la técnica de producción de gas.

4.4 Material y métodos

El experimento se realizó en el Módulo de Leche en Pastoreo y en el laboratorio de Microbiología Pecuaria de la Universidad Autónoma Chapingo. El área de estudio se ubica sobre las coordenadas 19°29' N, 98° 54' O y altitud de 2240 msnm el clima es templado subhúmedo, con lluvias en verano y precipitación y temperatura media anual de 636.5 mm y 15.2 °C, respectivamente (García, 1988).

Se usaron cuatro praderas de 12,000 m² cada una de 1, 2, 3 y 4 años de edad, las cuales estuvieron compuestas de alfalfa (*Medicago Sativa* L.) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.). Las praderas fueron divididas en tres lotes de 4,000 m², en cada lote se integraron dos sistemas de pastoreo intensivo rotacional: monoespecífico (cinco vacas Holstein Neozelandés en producción de 522 ± 77 kg de peso vivo) y mixto (cinco vacas Hostein Neozelandés y 18 borregas de 45 ± 4 kg de peso vivo), replicado dentro de lote. Los periodos de ocupación medio fueron de 3 días y los periodos de descanso de 32 días durante la época de verano (agosto-septiembre, 2015). El área total de trabajo fue de 4.8 ha. Para la asignación diaria de forraje, se consideró: a) el peso de las vacas, b) consumo absoluto de 3.2 kg MS 100 kg PV⁻¹ d⁻¹, c) la materia seca del suplemento y, d) la eficiencia de las cosechas del forraje por encima de 5 cm de altura de 70 %.

El manejo animal: las vacas se ordeñaron en dos veces al días en dos horarios: 6:30 y 15:30 h. Después de la ordeña cada vaca recibió 3.6 kg MS de concentrado y 4.3 kg MS de heno de alfalfa (Cuadro 6). El resto del día, las vacas permanecieron en el área de pastoreo. Las borregas estuvieron en el área de pastoreo entre las 8:00 y 18:00, el resto del tiempo permanecieron en un corral con agua limpia y fresca a voluntad. Después del primer ciclo de pastoreo (35 días) para adaptación, se iniciaron los muestreos de forraje

ofrecido (FO) antes de introducir a los animales, y de forraje rechazado después de los 3 días de ocupación de la pradera.

Tratamientos: los tratamientos fueron resultado de dos sistemas de pastoreo: monoespecífico (Pmn) y mixto (Pmx), y dos edades de praderas: jóvenes (uno y dos años) y maduras (tres y cuatro años), con tres repeticiones por tratamiento y dos dentro de lote (3x2). Los lotes fueron asignados al azar a grupos de vacas según el sistema de pastoreo (Pmn o Pmx).

Cuadro 6. Composición química del concentrado y el heno de alfalfa ofrecido posterior a la ordeña.

Componente	Concentrado	Heno de alfalfa
Materia seca, (MS) %	94.0	94.0
Proteína cruda, % MS	20.0	10.8
Extracto etéreo, % MS	0.9	2.5
Fibra detergente neutro, % MS	17.4	40.1
Fibra detergente ácido, % MS	2.2	23.8
Cenizas, % MS	21.0	12.0
Energía metabolizable ^s Mcal kg ⁻¹ MS	3.1	2.5

^s Estimada a partir de FDA.

Digestibilidad y fermentación ruminal *in vitro*: se tomaron muestras de forraje ofrecido y residual, y del suplemento. El forraje contenido en un área de 0.25 m² de la pradera fue cosecha manualmente, en sitios paralelos a los cortes previamente hechos para estimar el forraje ofrecido y residual. Las muestras fueron secadas en una estufa de circulación forzada de aire a 55°C a peso constante, se molieron en un molino Wiley® 4 con criba de un mm, y se almacenaron para posteriormente realizar las pruebas de fermentación.

La fermentación ruminal *in vitro* se determinó indirectamente por la técnica de producción de gas (Menke & Steigass, 1988). En frascos de 125 mL de capacidad, se adicionaron 500 mg MS de forraje o suplemento, 90 mL de

inóculo ruminal diluido (1:10) en una solución mineral reducida, y un flujo continuo de CO₂. Los frascos se cerraron herméticamente con un tapón de goma y un aro de aluminio y se incubaron a 39°C en un baño maría por 72 h. El volumen de gas de fermentación se midió a las 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60, y 72 horas de incubación. Al término de la incubación, el residuo de sustrato fermentado fue filtrado en papel a peso constante, secado a 65°C por 48 h en estufa y pesado, para determinar la materia seca residual. El inóculo ruminal se obtuvo mediante una sonda de plástico de cinco ovejas en pastoreo de las unidades experimentales. Cada litro de solución mineral reducida contenía Na₂CO₃ (0.6 g), K₂HPO₄ (0.45 g), KH₂PO₄ (0.45 g), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g), NaCl (0.9 g), MgSO₄ (0.18 g), CaCl₂ (0.12 g), Na₂S (0.25 g), L-Cisteína (0.25 g) y una gota de resarzurina (0.1%).

Con el volumen de gas se obtuvieron el volumen máximo (Vm; mL g⁻¹), tasa (S; h⁻¹) y tiempo de retardo (L; h) del modelo logístico $V_0 = V_m / (1 + \exp^{(2-4 \cdot S \cdot (T-L))})$ (Schofield & Pell, 1994), mediante el procedimiento NLIN de SAS. La digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) se determinó calculando el porcentaje de la MO digerida. Éstas últimas se obtuvieron por diferencia de la MO del sustrato original menos la del residuo de fermentación.

Digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica (DAMS, DAMO): se estimó la cantidad de masa de forraje ofrecido (FO) y residual (FR), para lo cual en cada lote se hicieron cuatro cortes en franjas de 0.52 m x 8 ± 1.8 m, con una podadora (Trupper® P-520) a una altura de 5 cm. La masa por debajo de los 5 cm se cosecho con tijeras a ras de suelo. La masa de FR se estimó con franjas paralelas a las de FO, de igual forma. Las muestras frescas se pesaron y posteriormente se secaron a 55°C por 48 h, en una estufa de circulación forzada de aire y se pesó la materia seca para calcular la masa de forraje ofrecido y residual (kg ha⁻¹). El consumo o cantidad de forraje cosechado por vaca según el sistema de pastoreo, se estimó por diferencia del FO y FR

(Lantinga *et al.*, 2004). El consumo de alimento total (AT) correspondió al CF más la cantidad de suplemento ($\text{kg vaca}^{-1} \text{d}^{-1}$).

La cantidad de heces excretadas por los animales, se estimó mediante el uso de óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador externo (Geerken *et al.*, 1987), para lo cual se les dio 5 g de Cr_2O_3 por vaca, después de cada ordeña y 0.4 g por borrega, antes y después del período de pastoreo. Se recolectaron muestras rectales de heces de los animales, durante el último día de pastoreo en cada potrero. Las muestras se secaron en una estufa de circulación forzada de aire a 55°C hasta peso constante y, se molieron en un molino Wiley® 4 con criba de 1mm. La concentración de cromo se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Fenton y Fenton, (1979), y la producción de heces se calculó con ecuación $\text{PF}=\text{DM}/\text{CMH}$ (Penning, 2004), donde: PF es la Producción fecal (g MS d^{-1}); DM es la dosis del marcador (g MS d^{-1}) y CMH es la concentración del marcador en heces (g g^{-1}). La producción fecal (PF) total de cada lote se dividió entre el número de animales por lote de cada tratamiento.

El consumo aparente de la materia seca o materia orgánica (CAMS, CAMO) ($\text{kg vaca}^{-1} \text{d}^{-1}$), correspondió a la diferencia de la materia seca u orgánica total consumida (AT) y de la materia seca u orgánica residual (FR).

La digestibilidad aparente en materia seca u orgánica (DAMS, DAMO) (%), se determinó a partir de la diferencia del CAMS u CAMO y la producción de heces (PF) de acuerdo con la ecuación: $\text{DAMS} = [(\text{CAMS}-\text{PF})/\text{CAMS}]*100$

Estimación de la asimilación por la TPG: la asimilación del alimento (ASIVm) se obtuvo por diferencia del volumen (mL g^{-1}) máximo de gas producido por el alimento total (VmAT) y por heces (Vmheces) (Ecuación 2). El Vm del alimento total se obtuvo de acuerdo a la proporción de forraje y suplemento consumidos para cada lote. Cuando ASIVm fue expresada en porcentaje (%ASIVm), ésta se dividió entre VmAT y se multiplicó por 100 (Ecuación 3).

$$ASIVm = Vm AT - Vm heces$$

(2)

$$PASIVm = \frac{Vm AT - Vm heces}{Vm AT} \times 100$$

(3)

Se estimó también el índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) considerando el VmAT y Vmheces, multiplicados por la cantidad respectiva de materia seca total (kg) por lote de animales por día (Ecuación 4).

$$IEPGF = (Vm AT * kg MS AT) - (Vm heces * kg MS heces)$$

(4)

Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento Proc Mixed de SAS 9.3 y el modelo estadístico que incluyó los efectos fijos de pastoreo, pradera, interacción pastoreo*pradera y, los efectos aleatorios de repetición dentro de la interacción pastoreo*pradera (Ecuación 5).

$$Y_{ijk} = \mu + pastoreo_i + pradera_j + pastoreo * pradera_{ij} \\ + aleatorio repetición (pastoreo * pradera) + e_{ijk}$$

(5)

Donde

Y_{ijkl} representó Vm, S, L, DIVMO del FO y FR, el consumo aparente en materia seca (CAMS) y orgánica (CAMO); digestibilidad aparente en materia seca (DAMS) y orgánica (DAMO); asimilación de alimento por medio de la TPG (ASIVm); el porcentaje de la asimilación del alimento (PASIVm) y el IEPGF.

$pastoreo_i = P_{mx}, P_{mn}$.

$pradera_j = \text{jóvenes y maduras}$

4.5 Resultados y discusión

No se encontró interacción ($P > 0.05$) $pradera \times pastoreo$ para ninguna de las variables analizadas. Los parámetros de producción de gas (V_m , S y L) del forraje ofrecido y forraje residual (Cuadro 7) no fueron afectados ($P > 0.05$) por el sistema de pastoreo, pero la del forraje residual fue mayor en el sistema de pastoreo monoespecífico ($P < 0.05$), lo que indica que el forraje dejado por las vacas en este último sistema, es de mayor calidad nutritiva que el del sistema de pastoreo mixto, posiblemente debido a que las borregas tienden a seleccionar estratos de forraje más inferiores que las vacas (Castro *et al.*, 2015; Nicol, Griffiths & Edwards, 2007).

Cuadro 7. Parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) del forraje ofrecido y residual de alfalfa-ovillo, en dos sistemas de pastoreo.

Forraje	Sistema de pastoreo	Parámetros de la cinética fermentación			DIVMO %
		V_m mL g ⁻¹	S h ⁻¹	L H	
Ofrecido	Monoespecífico	264±1.0	.022±.001	4.9±0.83	69±1.9
	Mixto	265±9.7	.024±.001	5.6±0.82	72±1.8
p		ns	ns	ns	ns
Residual	Monoespecífico	255±10	.023±.001	5.5±1.3	68±2.2
	Mixto	244±10	.022±.001	4.9±1	63±2.2
p		ns	ns	ns	**

V_m , volumen máximo a 72 h de incubación; S , tasa de producción de gas; L , tiempo lag; DIVMO, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.
 p = probabilidad; ns, no significativo; ** $p < 0.01$.

Con respecto a la edad de la pradera, se observó que los parámetros de la cinética de fermentación para el forraje ofrecido, fueron similares ($P > 0.05$) para

praderas jóvenes y maduras; sin embargo, la DIVMO fue 15% mayor ($P<0.01$) en las praderas maduras (Cuadro 8). La mayor digestibilidad pudo deberse a la maleza y pasto no sembrado, los cuales representaron más del 54% en las praderas maduras. Zhong *et al.*, (2016) encontraron que praderas de gramíneas-leguminosa producen menos gas de fermentación conforme avanza la edad a la cosecha, y se sabe que la calidad nutricional de las praderas se relaciona inversamente con la madurez del forraje (Mitsumori & Sun, 2008). En el forraje residual, la edad de las praderas no influyó en la cinética de fermentación y DIVMO (Cuadro 8). Varios estudios han comparado la producción de gas entre gramíneas y leguminosas pero los resultados de estos estudios varían con respecto a las especies, estados de madurez y medio ambiente (Ammar *et al.*, 2010), pero estos aspectos no afectaron la fermentación entre las praderas jóvenes y maduras, estudiadas en esta investigación.

Cuadro 8. Parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica del forraje ofrecido y residual de una pradera de alfalfa-ovillo de diferente edad.

		Parámetros de la cinética de fermentación			DIVMO %
Forraje	Edad de la pradera	Vm mL g ⁻¹	S h ⁻¹	L h	
Ofrecido	Joven ^p	268±13	.023±.001	3.7±1.1	66±2.2
	Madura ^a	261±13	.024±.001	6.8±1	76±2.2
<i>p</i>		ns	ns	ns	**
Residual	Joven	231±14	.021±.001	3.0±2	62±2.9
	Madura	268.5±14	.025±.001	7.3±2	69.4±3.0
<i>p</i>		ns	ns	ns	ns

^p Praderas jóvenes (uno y dos años); ^a Praderas maduras (tres y cuatro años).

Vm, volumen máximo a 72 h de incubación; S, tasa de producción de gas; L, tiempo lag; DIVMO, digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

p = probabilidad; ns, no significativo; ** $p<0.01$.

Respecto a las características de digestibilidad aparente y asimilación de alimento (Cuadro 9), la edad de la pradera afectó ($P<0.05$) la cantidad de alimento total, la materia seca residual de alimento, la digestibilidad aparente de la materia seca y materia orgánica. La pradera madura ofreció mayor ($P<0.05$) cantidad total de alimento (forraje más suplemento) disponible, pero también de forraje residual ($P<0.05$). A pesar de estas diferencias en AT y MS residual, el consumo aparente de la MS y MO no fue afectado por la edad de la pradera ($P>0.05$). La pradera madura ofreció mayor ($P<0.05$) cantidad total de alimento (forraje más suplemento) disponible, pero también de forraje residual ($P<0.05$). A pesar de estas diferencias en AT y MS residual, el consumo aparente de la MS y MO no fue afectado por la edad de la pradera ($P>0.05$). Lo anterior no se vio reflejado en la asimilación (ASIVG, %ASIVG) y el índice potencial de emisión de gases de fermentación (IPEGF), puesto que no se encontraron diferencias ($P>0.05$) entre praderas jóvenes y maduras (Cuadro 9).

Al contrario con los resultados del presente estudio, Jiménez (2015), no encontró efecto de la edad de la pradera sobre la consumo de alimento (por diferencia de masas de forraje ofrecido y residual, sin valorar el suplemento) ($P>0.05$), sin embargo, por medio de marcadores, encontró mayor consumo en las praderas jóvenes que en las maduras (3.0, 2.3 kg MS 100kg PV⁻¹, respectivamente) ($P<0.0001$) de praderas similares de uno, dos y tres años de edad bajo un pastoreo mixto.

Respecto al tipo de pastoreo, éste afectó ($P<0.05$) la disponibilidad de alimento total (AT), la materia seca residual en la pradera, la producción de heces, la digestibilidad aparente de la materia seca y el índice de emisión potencial de gases de fermentación (Cuadro 8).

El pastoreo monoespecífico causó una disponibilidad total (AT) de alimento mayor ($P<0.05$) que el pastoreo mixto. La alta disponibilidad de AT en el pastoreo monoespecífico causó una mayor ($P<0.05$) cantidad de materia seca residual en la pradera, entre otras razones porque en el sistema mixto se

incrementó en 22 y 6.6 % el consumo de MS y MO, aunque no llegó a ser diferente ($P>0.05$); Cuadro 9).

Por otro lado, en el pastoreo monoespecífico la digestibilidad aparente de la materia seca fue mayor ($P<0.05$) que en el pastoreo mixto, pero dado el consumo mayor ($P<0.05$) de MS en el sistema de pastoreo mixto (Cuadro 8), el índice de emisión de gases de fermentación es alto ($P<0.05$) comparado con el sistema monoespecífico.

Cuadro 9. Consumo aparente de la materia seca y orgánica, digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica, asimilación mediante gas de fermentación e índice de emisión potencial de gases de fermentación de forraje de praderas de alfalfa-ovillo en dos sistemas de pastoreo y edades.

	Pastoreo		p	^P Pradera		p
	Mono ^E	Mixto		Joven	Madura	
AT (kg vaca ⁻¹ d ⁻¹)	31.2±2.1	25.1±2.0	***	23.1±2.3	33.2±2.3	*
MS-residual	13.7±1.2	7.3±1.1	***	7.8±1.5	13.2±1.5	*
CAMS (kg vaca ⁻¹ d ⁻¹)	14±1.4	18±1.4	ns	15±1.8	20±1.8	ns
CAMO (kg vaca ⁻¹ d ⁻¹)	14±1.2	15±1.2	ns	13±1.5	17±1.5	ns
VmAT (mL g ⁻¹)	301±6	303±6	ns	309±8	295±8	ns
Heces(kg vaca ⁻¹ d ⁻¹)	19.5±.7	23±0.8	***	22.8±1	19.7±1	*
Vm heces (mL g ⁻¹)	55±4	56±4	ns	60±5.1	51±5	ns
DAMS (%)	74±2.4	70±2.3	*	66±3.1	79±3.2	*
DAMO (%)	76±2.1	74±2.1	ns	70±2.8	81±2.8	*
ASIVm (mL g ⁻¹)	246±6	248±6	ns	249±8	244±8	ns
%ASIGV	81±1.2	82±1.2	ns	81±1.6	83±1.6	ns
IEPGF (hL Lote ⁻¹ d ⁻¹)	880±185	1595±176	**	1288±207	1186±210	ns

^EPastoreo monoespecífico; ^P Praderas jóvenes (uno y dos años); ^Q maduras (tres y cuatro años). AT, alimento total (consumo de forraje más suplemento); MS-residual, materia seca residual; CAMS, Consumo aparente de la materia seca; CAMO, Consumo aparente de la materia orgánica; VmAT, volumen máximo de gas del alimento total; Vm hece, volumen máximo de heces; DAMS, digestibilidad aparente de la materia seca; DAMO, digestibilidad aparente de la materia orgánica, ASIVm, asimilación por medio de gas *in vitro*, IEPGF, índice de emisión potencial de gases de fermentación.

p = significancia; ns=no significativo; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Por otro lado, el análisis de la asimilación de la dieta, utilizando el Vm del alimento consumido y de las heces excretadas (ASIVm y %ASIVm), no demostró diferencias ($P > 0.05$) entre tipo de sistema de pastoreo ni el tipo de pradera, lo cual indicó que en ambos sistemas la calidad de la dieta y su asimilación fueron similares, y que la diferencia se encuentra en el comportamiento animal respecto al consumo y la producción de heces, de tal manera que si consideramos estos en el IEPGF se encuentra que el sistema mixto tendrá mayor impacto en el ambiente. No obstante, es conveniente considerar en otros estudios la proporción de metano y bióxido de carbono para un análisis más apropiado del impacto ambiental.

4.6 Conclusiones

El consumo aparente en MS y MO y la asimilación del forraje fueron similares para los dos sistemas de pastoreo y edad de la pradera, sin embargo, la digestibilidad aparente de la materia seca fue mayor en Pmn y en praderas maduras. Aunque la asimilación del forraje determinado por Vm (mL g^{-1}) no presentó diferencia por sistema de pastoreo, el IEPGF ($\text{hL d}^{-1} \text{ lote}^{-1}$) determinado por lote de animales, fue mayor en Pmx que en Pmn, indicando que el Pmx genera mayor emisión de gases de efecto invernadero. Finalmente, la TPG ofrece información útil para caracterizar sistemas de pastoreo

4.7 Literatura citada

- Ammar, H., López, S., & Andrés, S. (2010). Influence of maturity stage of forage grasses and leguminous on their chemical composition and *in vitro* dry matter digestibility. *Méditerranéennes*, 203(92), 199–203.
- Castro-Hernández, H., Domínguez-Vara, I.A., Morales-Almaráz, E., & Huerta-Bravo, M. (2017). Composición química, contenido mineral y digestibilidad *in vitro* de raygrás (Lolium perenne) según intervalo de corte y época de crecimiento. *Rev Mex Cienc Pecu*; 8(2): 201-210. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i2.4445>.

- Fenton, T.W., & M. Fenton. (1979). An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Canadian Journal of Animal Science* 59: 631-634.
- García, E. (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana). 4a. ed., Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 217 p.
- Geerken C., M., Calzadilla, D., & González, R. (1987). Aplicación de la técnica de dos marcadores para medir el consumo de pasto y la digestibilidad de la ración de vacas en pastoreo suplementadas con concentrado. *Pastos y Forrajes* 10: 266-273.
- Giraldo, L.A., Gutierrez, L.A., & Rúa, C. (2007). Comparación de dos técnicas *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 269–279. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v20n3/v20n3a05.pdf>.
- Jiménez R. J. D. (2015). Pastoreo mixto de vacas lecheras con borregas como seguidoras en alfalfa-ovillo. Tesis de Maestría. Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México, México.
- Khan A., Mahr-Un-Nisa, M., & Sarwar M. (2003). Review. Techniques measuring digestibility evaluation of feeds. *Int. J. Agri. Biol.*, (5):1.
- Lantinga, E. A., Neuteboom, J. H., & Meijis, J. A. C. (2004). Sward methods. In: *Herbage Intake Handbook*. Penning P. (Ed.). 2nd Ed. The British Grassland Society. Reading, UK. pp: 23-52.
- Menke, K. H., & H. Steingass. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*. 28: 7-55.
- Miranda-Romero L.A., Sandoval-González, L., & Améndola-Massioti, R. (2015a). Producción de gas como método para estimar *in vitro* la concentración de carbohidratos fermentables en rumen. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Puerto Varas, Chile. Hotel patagónico. p 474.
- Miranda R. L. A., Chávez, H. G., Martínez, M. L., Sánchez del Real, C., & Améndola M. R. (2015b). Asimilación de dietas por corderos estimada por la técnica de producción de gas *in vitro*. XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatría. Puebla, Puebla. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A. C. p 295.
- Mitsumori M, & Sun W B. (2008). Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21, 144–154.
- National Research Council. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

- Nicol, A.M., Griffiths, W.M., & Edwards, G.R. (2007). Integrated Livestock Management. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, Vol. 67.
- Penning, P. D. (2004). Animal-based techniques for estimating herbage intake. In: Herbage Intake Handbook. P. D. Penning (Ed.) 2nd Ed. The British Grassland Society. UK. pp: 53-84.
- Rodríguez, N., Oliveira, E., & Guimaraes, R. (2007). Uso de Indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto . LIPE, lignina purificada y enriquecida. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(35), 518–525.
- Shaver, R.D., Undersander, D.J., Schwab, E.C., Hoffman, P.C., Lauer, J., Combs, D.K., & Hoffman, P.C. (2002). Evaluating forage quality for lactating dairy cows. In Proc. Inter-Mountain Nutr. Conf., Salt Lake City, Utah. pp. 77-94.
- Vázquez, P. (2016). Aprovechamiento del nopal y tuna en la alimentación de ovinos. Tesis Doctoral. Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. 51-52 p. Disponible en https://chapingo.mx/produccionanimal/administrador/components/com_jresearch/files/publications/Res_tesis_P_Vazquez_Mendoza.pdf, consultado el 15 de abril de 2017.
- Zhong, R. Z., Fang, Y., Sun, H. X., Wang, M., & Zhou, D. W. (2016). Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(2), 414–423. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61036-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61036-X)