

## Nota Técnica

### Evaluación de vainas y hojas de árboles forrajeros por la técnica de producción de gas *in vitro*

Jorge Ezequiel Hernández Hernández<sup>1</sup>, Francisco Javier Franco Guerra<sup>1</sup>, Julio Cesar Camacho Ronquillo<sup>1</sup>, Oscar Agustín Villarreal Espino Barros<sup>1</sup>, Redimio Manuel Pedraza Olivera<sup>2</sup>, Fernando Xicotencatl Plata Pérez<sup>3</sup> y Germán David Mendoza Martínez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro. Tecamachalco, Puebla 4 Sur No 304, Col. Apartado Postal 75480. México

<sup>2</sup>Universidad de Camagüey, Facultad de Ciencias Agropecuarias Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal. Camagüey, 74650, Cuba

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. México.

\*Correo electrónico: gmendoza@correo.xoc.uam.mx

---

#### RESUMEN

Se estudió la cinética de producción de gas *in vitro* para conocer el potencial nutricional de hojas de arbóreas y vainas que crecen en una zona tropical seca de México usando heces bovinas como inóculo, comparadas con el pasto guinea como referencia (*Panicum maximum*). Se colectaron hojas y vainas de: *Prosopis laevigata*, *Pithecellobium dulce* y *Pithecellobium acatlense*; y sólo hojas de: *Amelanchier denticulata*, *Verbesiana crocata*, *Haemotoxylum brasiletto*, *Acacia bilimekii*, *Acacia pennatula*, *Acacia constricta* y *Lantana velutina*. El inóculo se preparó con heces bovinas recién depuestas disueltas en agua en proporción 1:3. Se estimaron los parámetros de la velocidad máxima de producción de gas (v), la tasa de producción (s) y la fase lag (l). Tres especies mostraron bajos valores de gas (8,34-11,4 ml), mientras que la mayoría fueron cercanos a los del pasto guinea (29 ml) con una tasa de producción similar (0,03 h<sup>-1</sup>). Con excepción de la vaina de *Pithecellobium acatlense*, el resto tuvo mayor producción de gas (33,8-46,3 ml) que el pasto guinea (25,6 ml) con una tasa de producción igual o mayor (0,03 a 0,06 h<sup>-1</sup>). Los resultados indican que las vainas de *Prosopis laevigata* y *Pithecellobium dulce* tienen un valor nutricional superior al del pasto guinea mientras que las hojas de *Haemotoxylum brasiletto* y *Prosopis laevigata* presentaron un valor similar. La técnica de producción de gas *in vitro* permite estimar el valor potencial de recursos forrajeros no convencionales.

*Palabras clave:* árboles forrajeros, producción de gas *in vitro*, hojas, vainas, inóculo.

---

#### *In vitro* gas production of leaves and pods of fodder trees from dry tropic using bovine faeces as inoculums

#### ABSTRACT

The kinetics of *in vitro* gas production to acknowledge the nutritional potential of tree leaves and pods that grow in a dry tropical area of Mexico using bovine faeces as inoculum, compared with guinea grass (*Panicum maximum*) as reference was studied. Leaves and pods were collected from: *Prosopis laevigata*, *Pithecellobium dulce* and *Pithecellobium acatlense*; and only leaves from: *Amelanchier denticulata*, *Verbesiana crocata*, *Haemotoxylum brasiletto*, *Acacia bilimekii*, *Acacia pennatula*, *Acacia constricta* and *Lantana velutina*.

The inoculums were prepared with fresh bovine faeces dissolved in water in 1:3 ratio. Parameters estimated were the maximum gas production (v), the production rate (s) and the lag phase (l). Three species showed low gas values (8,34-11,4 ml) while most were close to those of guinea grass (29 ml) with a similar production rate (0,03 h<sup>-1</sup>). In the pods, with exception of *Pithecellobium acatlense*, the others presented a higher gas production (33,8-46,3 ml) than guinea grass (25,6 ml) with a rate of production similar or greater (0,03 a 0,06 h<sup>-1</sup>). The results indicate that the pods of *Prosopis laevigata* and *Pithecellobium dulce* have nutritional value superior to that of guinea grass while leaves from *Haemotoxylum brasiletto* and *Prosopis laevigata* have a similar value. The gas production technique *in vitro* allows the estimation of the potential value of non-conventional feed resources.

**Keywords:** fodder trees, *in vitro* gas production, leaves, pods, inoculums.

## INTRODUCCIÓN

La técnica de producción de gas *in vitro* es comúnmente usada para conocer el valor nutritivo de los forrajes usando como inóculo bacterias ruminales (Ahmed y El-Hag, 2004), sin embargo, se han usado organismos del tracto posterior obtenidos de las heces (Martínez, 2005), lo cual, evita la necesidad de contar con animales con cánula ruminal o el uso de sondas para obtener el inóculo. Otros investigadores han comparado líquido fecal con ruminal (Aiple *et al.*, 1992), aún así existe cierta inconsistencia de los resultados con inóculos fecales (Mould *et al.*, 2005), por lo que se requieren más evaluaciones.

Se ha considerado que los árboles y arbustivas pueden jugar un papel estratégico en el suministro de nutrientes en sistemas extensivos particularmente durante la sequía, además que muchas leguminosas arbóreas son excelente fuente de proteína (Paterson *et al.*, 1998; Salem *et al.*, 2006). Considerando la importancia de caracterizar el valor nutritivo de forrajes disponibles para rumiantes en zonas tropicales con períodos de sequía prolongados donde pastorean cabras y venados (Franco *et al.*, 2005; Villarreal *et al.*, 2008), se estudió el follaje de árboles y arbustos con la técnica de gas *in vitro* evaluando el efecto biológico de los taninos, usando heces bovinas como inóculo comparando con el pasto guinea que ha sido evaluado por dicha técnica (Ives *et al.*, 2005; Mould *et al.*, 2005) y su valor energético para rumiantes ha sido caracterizado (Juarez *et al.*, 1999; INRA 1989).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se colectaron en diferentes áreas de 3 fincas del municipio de Piaxtla en región de la

Mixteca Poblana, entre los paralelos 17° 59' 00" y 18° 12' 30" latitud Norte, y los meridianos 98° 10' 54" y 98° 21' 36" latitud Oeste. Se colectaron muestras de enero a noviembre entre las 8:30 y 12:00 horas.

Se simuló el ramoneo caprino, separándose las hojas y vainas de cada tallo, a una altura sobre el nivel del suelo menor o igual a 2 m. Colectándose hojas y vainas de: *Prosopis laevigata* (Mezquite morado), *Pithecellobium dulce* (Huamuchil) y *Pithecellobium acatlense* (Barba de Chivo); y sólo hojas de: *Amelanchier denticulata* (Tlaxistle negro), *Verbesiana crocata* (Capitaneja), *Haemotoxylum brasiletto* (Palo de Brasil), *Acacia bilimekii* (Tehuistle), *Acacia pennatula* (Cubata Blanca), *Acacia constricta* (Chaparro) y *Lantana velutina* (Manzanita). Se uso pasto guinea (*Panicum maximum*) como referencia para comparar los valores de cinética de producción de gas.

Se adquirieron muestras de la misma especie, al menos de 3 árboles o arbustos, de cada finca; se crearon muestras compuestas que se colocaron, para su traslado en bolsas plásticas dentro de una hielera. Luego fueron secados a 55° C por 48 h en una estufa con circulación forzada de aire y molidos en un molino de martillo hasta un tamaño menor a 1 mm para análisis.

Para realizar el análisis de producción de gas *in vitro*, se utilizó de acuerdo al procedimiento de Menke y Steingass (1988), en jeringuillas de cristal calibradas de 100 ml de capacidad (Fortuna®, Häberle Labortechnik, Alemania), empleando como inóculo heces bovinas recién depuestas, que se disolvieron en agua en proporción 1:3, y prepararon con la solución buffer (Martínez, 2005). Se pesaron 200 mg de las muestras secas, que se colocaron en las jeringuillas,

agitándose cuidadosamente al momento de colocarlas y al realizar las lecturas de su volumen después de 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación.

En cada incubación se colocaban de 2 a 3 jeringuillas blanco conteniendo solamente la solución inóculo: buffer y 2 jeringuillas que contenían 200 mg de hierba de Guinea (*Panicum maximum*) seca y molida. Las muestras se incubaron en triplicado en cada corrida experimental.

Los valores de producción de gas acumulado se ajustaron con el modelo propuesto por Menke y Steingass (1988):  $Y = v / (1 + \exp(2 - 4 * s * (t - L)))$ , donde Y= volumen total de gas producido, v= volumen, s= tasa de producción de gas, t= tiempo y L= tiempo lag o de retardo. Cada ensayo se repitió 2 veces con 3 replicas por substrato evaluado con sus blancos respectivos. Los resultados se analizaron de acuerdo a un diseño de bloques generalizados completamente al azar usando el criterio de incubación como criterio de bloqueo en cada ensayo (Pinos *et al.*, 2002) y las medias se compararon con la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de cinética de producción de gas *in vitro* de las hojas de las especies y del pasto guinea, indicando que los de mejor valor potencial nutritivo ( $P < 0,05$ ), serían las del Palo de Brasil (*Haemotoxylum brasiletto*) y Mezquite morado (*Prosopis laevigata*), las de menor valor serían las de baja degradabilidad que presentaron la menor tasa de producción de gas ( $P < 0,05$ ), Tehuistle (*Acacia bilimekii*), Capitaneja (*Verbesiana crocata*) y Manzanita (*Lantana velutina*). Los resultados de las vainas completas se presentan en el Cuadro 2, donde se puede apreciar que con excepción del de Barba de Chivo (*Pithecellobium acatlense*), el valor energético es potencialmente superior ( $P < 0,05$ ) al del pasto guinea. Las diferencias en la fermentabilidad, tasa de producción de gas y fase lag en arboles tropicales forrajeros, han sido asociadas a la gran variabilidad de su composición química de proteína, fibra neutro detergente (FDN), fibra ácido detergente (FDA) y presencia de compuestos antinutricionales como taninos (Larbi *et al.*, 1998; Salem *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* de hojas de diferentes arbustivas y del pasto guinea.

Especie	Volumen máximo (Y; ml)	Tasa de producción (s; h <sup>-1</sup> )	Tiempo lag (h)
Guinea	29,16 a	0,0339 ab	11,86 ab
Brasil	28,50 a	0,0363 ab	6,76 abc
Mezquite morado	25,91 ab	0,0396 ab	6,42 bc
Tlaxistle Negro	22,77 abc	0,0297 b	1,84 c
Huamúchil	22,13 abc	0,0331 ab	4,33 bc
Barba de chivo	20,49 abc	0,0238 b	4,75 bc
Chaparro	19,50 abc	0,0197 b	11,02 ab
Tehuistle	11,39 c	0,0393 ab	0,84 c
Capitaneja	8,59 c	0,0509 a	15,09 a
Manzanita	8,34 c	0,0246 b	11,33 ab
EEM	2,01	0,0028	1,16

ab literales diferentes en la misma columna son diferentes (Tukey  $P < 0,05$ ).

Barba de Chivo (*Pithecellobium acatlense*), Huamúchil (*Pithecellobium dulce*), Tlaxistle Negro (*Amelanchier denticulata*), Mezquite morado (*Prosopis laevigata*), Capitaneja (*Verbesiana crocata*), Palo de Brasil (Brasil) (*Haemotoxylum brasiletto*), Tehuistle (*Acacia bilimekii*) y Cubata Blanca (*Acacia pennatula*), Chaparro (*Acacia constricta*), Manzanita (*Lantana velutina*).

EEM: Error estándar de la media.

Cuadro 2. Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* de vainas de diferentes arbustivas y del pasto guinea.

Especie	Volumen máximo (Y; ml)	Tasa de producción (s; h <sup>-1</sup> )	Tiempo lag (h)
Guinea	25,58 c	0,0339 ab	11,86 ab
Mezquite morado	46,30 a	0,0666 b	2,87 b
Huamúchil	33,85 b	0,0441 c	3,89 b
Barba de chivo	15,24 d	0,0322 c	1,78 b
EEM	0,55	0,0028	1,16

ab literales diferentes en la misma columna son diferentes (Tukey P<0,05).

Guinea (*Panicum maximum*), Mezquite morado (*Prosopis laevigata*), Huamúchil (*Pithecellobium dulce*), Barba de Chivo (*Pithecellobium acaulense*).

EEM: Error estándar de la media.

Se observó una gran diversidad en la fase lag, lo cual puede indicar que existen plantas altamente susceptibles como aquellas que tiene la fase lag menores a las 2 horas, medianamente susceptibles (entre 2 y 5 horas) y aquellas que presentan alguna dificultad para que los microorganismos ruminales inicien el proceso de digestión (Menke y Steingass, 1988, Mauricio *et al.*, 1999). Algunos investigadores (Nsahlai *et al.*, 1995; Khazaal *et al.*, 1996), indican que los compuestos antinutricionales de algunos árboles multipropósito pueden afectar la fermentación ruminal, lo cual, podría estar afectando la fase lag y la producción total de gas *in vitro*. La fase lag es mayor en forrajes de mala calidad (Amjed *et al.*, 1992), alargándose cuando se combinan forrajes con almidón o por condiciones acidez en el medio de incubación ruminal (Mertens y Loften, 1980).

La producción de gas de hojas, con menor producción de gas está asociada a un menor valor energético (Menke y Steingass, 1988; Blümmel *et al.*, 1996; Pedraza, 2000). Las hojas con valor equivalente al del pasto guinea y las vainas superiores, tienen buen potencial para usarse en la alimentación de rumiantes de acuerdo a su producción de gas (Khazaal *et al.*, 1996; Pedraza, 2000). Los valores obtenidos para las plantas que tuvieron mayor producción de gas fueron similares a los que muestran las hojas de *Leucaena leucocephala* y *Gliricidia sepium*, analizadas por Martínez (2005), con el mismo tipo de inóculo. Las tasas de digestión son equivalentes a los de otras plantas arbóreas y arbustivas con potencial forrajero (Pedraza, 2000; Galindo *et al.*, 2005).

El mayor valor nutritivo de las vainas en comparación al de las hojas, se debe a que están llevan semillas lo cual repercute en su valor energético. Estudios comparativos de la composición química de hojas y vainas completas de soya, muestran que estas últimas tienen mayor contenido de proteína y grasa (Tobia y Villalobos, 2004). Otras vainas como las de leucaena han sido reportadas con un alto valor de proteína (Urdaneta *et al.*, 1998). En plantas como el plátano, las vainas tienen menor proteína que las hojas, pero representan un aporte energético importante con una digestibilidad *in situ* del 53,3% (Subramanian *et al.*, 1988).

Las vainas pueden considerarse como ingredientes energéticos dado que su concentración de proteína es menor, Bárcena *et al.* (2009), analizó vainas de árboles forrajeros de la zona y encontró que las vainas tenían valores entre 6,4% y 11,1% de proteína, con valores de digestibilidad *in vitro* entre 40,55 y 58,85%, mientras que las hojas pueden considerarse principalmente proteínicas dado que la concentración de proteína era mayor, por ejemplo para las hojas de *Verbesiana crocata*, Bárcena *et al.* (2009), reportan valores entre 19,28 y 25,8% de proteína. Los valores de gas *in vitro* de este estudio sugieren que algunas hojas pueden ser importante fuente de energía y de proteína para los rumiantes que consumen este tipo de arbustivas como cabras y venados (Franco *et al.*, 2005, Villarreal *et al.*, 2008) y que las heces pueden usarse como inóculo para la evaluación, sin embargo es necesario continuar la caracterización nutricional de estos recursos.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de cinética de gas *in vitro* en relación con el pasto guinea, permiten concluir que las vainas de *Prosopis laevigata* y *Pithecellobium dulce*, tienen un valor nutricional superior al del pasto guinea mientras que las hojas de *Haemotoxylum brasiletto* y *Prosopis laevigata*, tienen un valor similar. La técnica de producción de gas *in vitro* permite estimar el valor potencial de recursos forrajeros no convencionales.

## LITERATURA CITADA

- Ahmed M.M.M. and F.M. El-Hag 2004. Degradation characteristics of some Sudanese forages and tree pods using *in sacco* and gas production techniques. *Small Rum. Res.*, 54 (1):147-156.
- Aiple K.P., H. Steingass and K.H. Menke. 1992. Suitability of a buffered faecal suspension as the inoculum in the Hohenheim gas test. 1. Modification of the method and its ability in the prediction of organic matter digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeds compared with rumen fluid as inoculum. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 67 (1): 57-66.
- Amjed J.M., H.G. Jung and J.D. Donker. 1992. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. *J. Anim. Sci.*, 70(9): 2877-2884.
- Bárcena G.R., P.A. Hernández, M. Meneses, E. Bribiesca y M.M. Crosby. 2009. Composición nutrimental y valor nutritivo de los forrajes del Estado de Puebla. Fundación Produce de Puebla, A.C. Colegio de Postgraduados. Puebla, México. P 29.
- Blümmel M.P. C.A. Goodchild, and K. Becker. 1996. Grinding energy and *in vitro* gas technique for assessment of Syrian barley straws: Physical and microbial degradation and voluntary feed intake by sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nut.*, 76 (2): 132-140.
- Franco F.J., G.A. Gómez, G.D. Mendoza, R. Bárcena, R. Ricalde, F. Plata and J. Hernández. 2005. Influence of plant cover on dietary selection by goats in the Mixteca region of Oaxaca, Mexico. *J. Appl. Anim. Res.*, 27(2):95-100.
- Galindo J., D. Delgado, R. Pedraza y D.E. García. 2005. Impacto de los árboles, los arbustos y otras leguminosas en la ecología ruminal de animales que consumen dietas fibrosas. *Pastos y Forrajes*, 28 (1): 59-68.
- INRA. 1989. Ruminant Nutrition: Recommended allowances and feed tables. Ed. Jarrige R. INRA. John Libbey Eurotext. Paris, France. P 389.
- Ives C.S.B., S.L.S. Cabral, S.P. Gobbo, H. Louvandini, D.M.S.S. Vitti any A.L. Abdalla. 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124 (1): 95-105
- Juarez L.F.I., D.G. Fox , R.W. Blake any A.N. Pell. 1999. Evaluation of tropical grasses for milk production by dual-purpose cows in tropical Mexico *J. Dairy Sci.*, 82 (10): 2136-2145.
- Khazaal K., Z: Parissi, C. Tsiouvas, A. Nastis any E.R. Ørskov. 1996. Assessment of phenolic related antinutritive levels using *in vitro* gas production technique: a comparison between different types of polyvinylpyrrolidone or polyethyleneglycol. *J. Sci. Food Agric.*, 71 (4): 405-414.
- Larbi A., J.W. Smith, I.O. Kurdi, I.O. Adekunle, A.M. Raji any D.O. Ladipo. 1998. Chemical composition, rumen degradation, and gas production characteristics of some multipurpose fodder trees and shrubs during wet and dry seasons in the humid tropics. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 72 (1):81-96.
- Martínez S.J. 2005. Implementación de la técnica de producción de gas *in vitro* con heces vacunas como inóculo y su empleo para evaluar el follaje de algunas leguminosas arbustivas. Tesis de Master en Producción Bovina Sostenible. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba. P 73.
- Mauricio R.M., M.L. Mould, M.S. Dhanoa, E. Owen K.S. Channa y M.K. Theodoruo, M.K. 1999. A semi automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 79 (4) 321-330.
- Menke, K.H. any H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from the chemical

- analysis and the *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.*, 28, 7-55.
- Mertens D.R. any J.R. Loften. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro* *J. Dairy Sci.*, 63(9):1437-1446.
- Mould F.L., K.E. Kliem, R. Morgan any R.M. Mauricio. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124 (1): 31-50.
- Nsahlai I.V., N.N. Umunna any D. Negassa. 1995. The effect of multipurpose tree digesta on *in vitro* gas production from Napier grass or neutral detergent fibre. *J. Sci. Food Agric.*, 69 (4): 519-528.
- Paterson R.T., G.M. Karanja, R.L. Roothaert, O.Z. Nyaata ade I.W. Kariuki. 1998. A review of tree fodder production and utilization within smallholder agroforestry systems in Kenya. *Agrofor. Syst.*, 41(2):181-199.
- Pedraza, R.M. 2000. Valoración nutritiva del follaje de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. y su efecto en el ambiente ruminal. Tesis de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal - Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba. P 126.
- Pinos R.J.M., S. González, G.D. Mendoza, R. Bárcena,yy A. Martínez. 2002. Análisis estadísticos de experimentos de digestibilidad *in vitro* con forrajes. *Interciencia*, 27(3):143-146.
- Salem A.Z.M., M.Z.M. Salem, M.M. El-Adawy ady P.H. Robinson. 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: Secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 127 (3): 251-267.
- Steel R.G.D ady J.C. Torrie .1980. Principles and Procedures of Statistics. 2da ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Subramanian P.R., R. Kadirvel, K. Viswanathan ady D. Chandrasekaran. 1988. *In vitro* studies and short-term feeding trial in lambs to evaluate plantain sheath (*Musa sapientum*) as a feed for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 20 (4):343-348.
- Tobia, C. y E. Villalobos. 2004. Producciónny valor nutricional del forraje de soya en condiciones tropicales adversas. *Agron. Costarricense*, 28 (1):17-25.
- Udaneta J., R. Razz y T. Clavero. 1998. Contenido de proteína cruda y materia seca de las vainas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 15 (3): 262-265
- Villarreal O.A., L.E. Campos, T.A. Castillo, I. Cortes, F, Plata y G.D. Mendoza. 2008. Composición botánica de la dieta del venado Temazate rojo (*Mazama temama*), en la sierra nororiental del estado de Puebla. *Universidad y Ciencia*, 24 (3):183-188.