



**Universidad Estatal Península de Santa  
Elena**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Carrera de Agropecuaria**



**EFECTO DE SAPONINAS Y FORRAJE, *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba*, SOBRE LA POBLACIÓN DE PROTOZOARIOS Y PRODUCCIÓN DE GAS METANO, EN FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**TRABAJO DE**

**Autor:** Kenia Brighite Pidru Gómez

**La Libertad, 2021**



**Universidad Estatal Península de Santa  
Elena**



**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Carrera de Agropecuaria**

**EFECTO DE SAPONINAS Y FORRAJE, *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba*, SOBRE LA POBLACIÓN DE PROTOZOARIOS Y PRODUCCIÓN DE GAS METANO, EN FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previo a la obtención del Título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor/a:** Kenia Brighite Pidru Gómez

**Tutor/a:** Dra. Debbie Chávez, MSc.

**La Libertad, 2021**

## TRIBUNAL DE GRADO



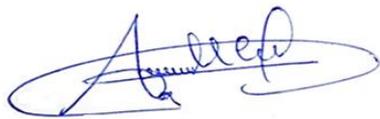
---

Ing. Néstor Acosta Lozano, PhD.  
**DECANO (E) DE LA FACULTAD  
CIENCIAS AGRARIAS  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Nadia Quevedo Pinos, PhD.  
**DIRECTOR/A DE CARRERA  
AGROPECUARIA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



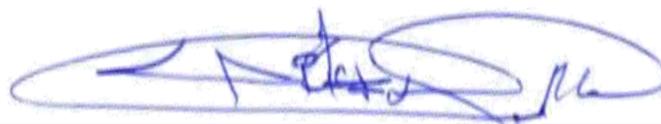
---

Ing. Verónica Andrade Yucailla, PhD.  
**PROFESOR DEL ÁREA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Debbie Chávez García, MSc.  
**PROFESOR TUTOR  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Abg. Víctor Coronel Ortiz, Mgt  
**SECRETARIO GENERAL (E)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Reconozco que las investigaciones o trabajos obtienen mejores resultados con el apoyo de conocimientos científicos, académicos, recursos económicos y apoyo moral.

Por ello agradezco a Dios porque sé, que el principio de la sabiduría es el temor a Jehová. Agradezco a mis amados padres Luis Pidru Puenchera, Julia Gómez Laínez por siempre contar con su amor, apoyo afectivo, moral, económico y sobre todo por nunca dejarme sola durante toda la carrera universitaria, enseñándome a luchar sin importar los obstáculos presentes con perseverancia y constancia.

Agradezco a mis apreciados y amados hermanos Kelly Pidru Gomez, Luis Pidru Gomez, por enseñarme el significado de cuidar, valorar y lograr los sueños anhelados, a esforzarse a pesar de las contrariedades, sin olvidar lo importante que es la vida.

A mi querida familia cristiana por brindarme cariño, apoyo moral y económico, no descuidándome en sus oraciones para cumplir mis metas, en especial: Luis Calderón Alay, Pastor Fausto Plúas, Pastora Alicia Catuto, Rebeca de la O.

A mis queridos amigos universitarios por todo el sustento moral, económico y empático, demostrando que un buen trabajo nace de un excelente equipo, personalmente a: Erika Panchana, Isabel Cabrera, Angélica Zambrano, Katherine Solano, Frixon Solano, Anthony Cruz y Lester Auria por toda la colaboración, conocimiento científico y cariño que compartieron.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad estatal península de Santa Elena, mis sinceros agradecimientos por demostrar valor, ética, enseñanza, paciencia, cariño, responsabilidad e importancia durante todo mi proceso académico, en especial a mi estimada tutora Doctora Debbie Chávez por contar siempre con su ayuda.

Al Ingeniero Marcos Barro Rodríguez y Sixto Mayorga, por la colaboración técnica y científica de las instalaciones en realización del tema de investigación.

Gracias por el apoyo incondicional

## **DEDICATORIA**

A Dios por tener el control de todo y enseñarme a reconocer que sin esfuerzo nada es posible.

A todas aquellas personas que se esfuerzan por lograr sus objetivos, sin importar las barreras que sientan física y emocionalmente.

A mis amigos, compañeros y docentes universitarios por compartir: los desvelos, viajes, cambios de carácter, alegrías, preocupaciones, recursos económicos y toda aquella acción que genera un esfuerzo continuo.

Aquellos padres, hermanos(as), tíos(as), abuelos(as), primos(as) que luchan para que sus seres queridos logren sus sueños, ofreciendo siempre sus recursos, porque todo esfuerzo conlleva recompensa.

A toda la fuerza productiva, laboral, empresarial y educativa que se esmeran a cada minuto por obtener un mejor porvenir para nuestro país ECUADOR.

En especial a mis padres: Luis Pidru Puenchera, Julia Gómez Laínez y hermanos Kelly Pidru Gómez, Antonio Pidru Gómez por contar con su protección, fortaleza. ayuda económica, espiritual, cariño y amor, a mi amigo: Luis Calderón Alay por su ayuda incondicional.

## RESUMEN

El presente estudio se realizó en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua ubicado a 20 km del sur de Ambato, donde se evaluó el efecto de saponinas y forrajes como *Moringa oleífera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba* sobre la población protozoaria, producción de metano entérico realizada en fermentación ruminal *in vitro*. Se utilizaron seis toros fistulados con peso de  $413 \pm 34$  kg en la obtención de líquido ruminal, incorporados con saliva artificial para dar apariencia al rumen del bovino, los tratamientos fueron dosis de saponinas al 0, 0.02 y al 0.04% con forrajes *Moringa oleífera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba* utilizados después de 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación para determinar la cantidad de metano entérico y para valorar la población protozoaria transcurrieron 12 y 24 horas de fermentación visualizándose dos clases de protozoos holotricos y entodiniomorfos. Se halló que los tratamientos 6, 7, 8 después de 24 horas de fermentación *in vitro* ocasionaron lisis celular protozoaria, estos datos no fueron significativos para disminuir la elaboración de metano entérico por motivo que las dosis de saponina estuvieron inadecuadas. Se conoció que el factor que más influye en la elaboración de metano es la cantidad de fibra que contiene un pasto.

**Palabras claves:** bovino, fermentación, forrajes, gas metano, incubación, protozoos

## ABSTRACT

The present study was carried out in the Cevallos canton, province of Tungurahua, located 20 km south of Ambato, where the effect of saponins and forages such as *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba* on the protozoan population and enteric methane production during *in vitro* ruminal fermentation was evaluated. Six fistulated bulls weighing  $413 \pm 34$  kg were used to obtain ruminal liquid, incorporated with artificial saliva to give appearance to the bovine rumen, the treatments were doses of saponins at 0, 0.02 and 0.04% with forages *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba* used after 3, 6, 9, 12, 24, 24, 48, 72 and 96 hours of incubation to determine the amount of enteric methane and to evaluate the protozoan population after 12 and 24 hours of fermentation, visualizing two classes of holotrophic and entodiniomorph protozoa. It was found that treatments 6, 7, 8 after 24 hours of *in vitro* fermentation caused protozoan cell lysis, these data were not significant to reduce the production of enteric methane because the doses of saponin were inadequate. It was known that the factor that most influences methane production is the amount of fiber contained in a pasture.

**Keywords:** bovine, fermentation, forages, methane gas, incubation, protozoa

"El contenido del presente Trabajo de Graduación es de mi responsabilidad; el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena".

Kenia Pedro 

---

Firma digital del estudiante

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1  |
| <b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....                            | 3  |
| 1.1. Ganadería en Ecuador.....   | 3  |
| 1.2. Nutrición y alimentación de bovino .....                              | 3  |
| 1.3. Forraje <i>Moringa oleífera</i> .....                                 | 5  |
| 1.3.1. Valor nutricional de <i>Moringa oleífera</i> .....                  | 5  |
| 1.4. Forraje <i>Gliricidia sepium</i> .....                                | 6  |
| 1.4.1. Valor nutricional de <i>Gliricidia sepium</i> .....                 | 6  |
| 1.5. Forraje <i>Morus alba</i> .....                                       | 7  |
| 1.5.1. Valor nutricional de <i>Morus alba</i> .....                        | 7  |
| 1.6. Efecto de la ganadería en el medio Ambiente .....                     | 7  |
| 1.6.1. Gases de efecto invernadero .....                                   | 8  |
| 1.6.2. Gasto energético por producción de gases de efecto invernadero..... | 9  |
| 1.7. Fermentación .....  | 9  |
| 1.8. Composición de los alimentos .....                                    | 9  |
| 1.9. Proceso de digestión en el retículo-rumen.....                        | 9  |
| 1.10. Población microbiana ruminal.....                                    | 10 |
| 1.11. Fermentación ruminal entérica .....                                  | 11 |
| 1.11.1. PH Ruminal .....   | 11 |
| 1.11.2. Elaboración de metano entérico .....                               | 12 |
| 1.11.3. Producción de microorganismos metanogénicos .....                  | 12 |
| 1.11.4. Población de protozoos.....  | 12 |
| 1.12. Producción de gas.....   | 14 |
| 1.13. Simulación de obtención de gas <i>in vitro</i> .....                 | 15 |
| 1.14. Estrategias para disminuir metano.....                               | 16 |
| 1.14.1. Manejo de nutrición.....   | 16 |
| 1.14.2. Calidad de alimentos .....   | 16 |
| 1.14.3. Incorporación de saponinas .....                                   | 17 |
| <b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                              | 19 |
| 2.1. Ubicación del ensayo.....   | 19 |
| 2.2. Materiales y Equipos .....  | 19 |
| 2.2.1. Materiales biológicos.....  | 19 |
| 2.2.2. Materiales de laboratorio .....                                     | 19 |
| 2.2.3. Materiales o reactivos para elaboración de saliva artificial.....   | 20 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.4. Materiales vegetales .....   | 20        |
| 2.2.5. Materiales de campo.....   | 20        |
| 2.3. Diseño experimental y tratamientos .....   | 21        |
| 2.3.1. Tratamientos .....   | 21        |
| 2.3.2. Diseño experimental.....   | 21        |
| 2.3.3. Manejo del experimento .....   | 22        |
| 2.3.4. Variables evaluativas.....   | 23        |
| 2.3.5. Análisis estadístico .....   | 24        |
| <b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>25</b> |
| 3.1. Cinética de fermentación de materia seca <i>in vitro</i> de <i>Moringa oleífera</i> .....  | 25        |
| 3.2. Cinética de fermentación de materia seca <i>in vitro</i> de <i>Gliricidia sepium</i> ..... | 27        |
| 3.3. Cinética de fermentación de materia seca <i>in vitro</i> de <i>Morus alba</i> .....        | 29        |
| 3.4. Cinética de fermentación de materia seca <i>in vitro</i> y población de protozoos .....    | 31        |
| <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Conclusiones</b> .....   | 35        |
| <b>Recomendaciones</b> .....  | 35        |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   |           |
| <b>ANEXOS</b>   |           |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Principales protozoos en el rumen con sustratos de preferencias.....   | 13 |
| Tabla 2. Tratamientos de la investigación .....   | 21 |
| Tabla 3. Grados libertad del experimento .....  | 21 |
| Tabla 4. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tratamientos 1, 2 y 3 de la materia seca “moringa” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%. .....    | 25 |
| Tabla 5. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tratamientos 4, 5 y 6 de la materia seca “gliricidia” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%. ..... | 27 |
| Tabla 6. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tratamientos 7, 8 y 9 de la materia seca “morera” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%. .....     | 29 |
| Tabla 7. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> “todos los tratamientos” con dosis de saponina al 2 y 4% y población protozoaria.....                             | 31 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Ubicación del ensayo .....  | 19 |
| Figura 2. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tratamientos 1, 2 y 3 de la materia seca “moringa” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4% .....    | 26 |
| Figura 3. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tratamientos 4, 5 y 6 de la materia seca “gliricidia” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4% ..... | 28 |
| Figura 4. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tratamientos 7, 8 y 9 de la materia seca “morera” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4% .....     | 30 |
| Figura 5. Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> todos los tratamientos de materia seca, con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4% .....                      | 33 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Tabla 1A. Datos generales, producción de metano entérico *in vitro* *Moringa oleífera*
- Tabla 2A. Datos generales. producción de metano entérico de *Gliricidia sepium*
- Tabla 3A. Datos generales. producción de metano entérico de *Morus alba*
- Tabla 4A. PH de materia seca incubada *Moringa oleífera*, *Gliricidia sepium* y *Morus alba* en análisis de la población protozoaria
- Tabla 5A. Análisis de varianza de producción de gas metano, después de 3 horas de incubación de la materia seca por INFOSTAD
- Tabla 6A. Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 9 horas de incubación por INFOSTAD.
- Tabla 7A. Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 12 horas de incubación por INFOSTAD.
- Tabla 8A. Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 24 horas de incubación por INFOSTAD.
- Tabla 9A. Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 48 horas de incubación por INFOSTAD.
- Tabla 10A. Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 72 horas de incubación por INFOSTAD
- Tabla 11A. Análisis de la varianza de población protozoaria. después de 12 horas de incubación por INFOSTAD
- Tabla 12A. Análisis de la varianza de población protozoaria. después de 24 horas de incubación por INFOSTAD
- Figura 1A. Frascos ámbar para incubación de materia seca *in vitro*
- Figura 2A. Preparación de pesos de muestras para incubación *in vitro*
- Figura 3A. Reactivos para preparación de saliva artificial
- Figura 4A. Obtención de líquido ruminal
- Figura 5A. Preparación de saliva artificial
- Figura 6A. Saliva artificial en baño maría. aplicando dióxido de carbono
- Figura 7A. Toma de volumen y presión de gas metano
- Figura 8A. Transductor de presión DELTA OHM
- Figura 9A. Monitor multigas. verificación de gas metano y dióxido de carbono
- Figura 10A. Materias secas incubadas *in vitro*
- Figura 11A. Materias secas incubadas en estufa para obtención de protozoos

Figura 12A. Extracción de materia seca incubada para visualización de protozoos

Figura 13A. Muestras colocadas en micro tubos y aplicación de azul metileno

Figura 14A. Limpieza de cámara neubauer

Figura 15A. Contabilización de protozoos

Figura 16A. Utilización de microscopio óptico

Figura 17A. Protozoo holotrico encontrado en las materias secas incubadas *in vitro*

Figura 18. Protozoo entodiniomorfo encontrado en las materias secas incubadas *in vitro*

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera de bovinos en Ecuador incrementa en el transcurso de los años, debido al crecimiento de la demanda de alimentos, presentada en la población, especialmente por carne de res o productos lácteos, sin embargo para satisfacer dicha demanda existen diferentes sistemas de producción ganadera que van desde: extensiva, intensiva y semiintensiva provocando daños al medio ambiente, reflejado en la atmósfera, esto se debe por la presencia de gases de efecto invernadero (GEI) como son: (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O). Dicha información es respaldada por la FAO que muestra en la acción ganadera el 15% gas de efecto invernadero (GEI), 7.1 gigatoneladas de dióxido de carbono al año (CO<sub>2</sub>/año), provocado por la actividad del hombre (Bonilla Cárdenas and Lemus Flores, 2012).

La cantidad de gases como: metano, dióxido de carbono y óxido nitroso (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O) generados en la digestibilidad de forrajes de gramíneas o leguminosas en el proceso de la fermentación ruminal, con la descomposición de fibra y lignina se puede presentar un aumento de metano entérico y esto a la vez puede ocasionar pérdidas de energía en el bovino, por ello es importante analizar la especie de forraje que se está empleando en la alimentación del animal (Hristov *et al.*, 2013).

Por ende, en la actualidad se presentan investigaciones referentes a los metabolitos secundarios tales como: taninos, compuestos cianogénicos y saponina, puesto que son compuestos que actúan en la fermentación ruminal (Rodríguez *et al.*, 2007).

También en la evaluación de dietas nutricionales a base de leguminosas y fruto de *Sapindus saponaria* (contenido de saponinas en su estructura), donde se muestra cambios ruminales en la fermentación de rumiantes, bajando las cantidades de metano, por la reducción de protozoos (Avila-Serrano *et al.*, 2020).

Cuyas investigaciones indican la supresión de metanogénesis ruminal por saponinas, este proceso es ocasionado por la interacción de las moléculas de saponinas con las membranas de los protozoos lo que ocasiona la presencia de lisis celular, provocando la eliminación de población protozoaria (Zhou *et al.*, 2011).

Por consiguiente el presente trabajo desea mostrar el efecto que causa la incorporación de diferentes dosis de saponinas y especies forrajeras en formación de gas metano, elaborada en la fermentación ruminal de bovino; para poder tomar como alternativa en la dietas

alimenticias y disminuir la pérdida de energía del ganado, la misma que puede ser aprovechada para ser transformada en carne o leche y por consiguiente, disminuir la contaminación del medio ambiente, con la reducción de los gases de efecto invernadero.

**Problema Científico:**

¿La incorporación de saponinas y forrajes como *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba*, realiza cambios en la fermentación ruminal, provocando la reducción de la población de protozoarios y baja la producción de gas metano?

**Objetivo de la investigación:**

**Objetivo general:**

Evaluar el efecto de saponina y forrajes tales como *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba* sobre la población protozoaria, producción de metano entérico realizada en la fermentación ruminal *in vitro*.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar el efecto de la incorporación de forrajes y saponinas sobre la población de protozoarios ruminales.
2. Diagnosticar la cantidad de metano entérico *in vitro* por materia seca incubada con la incorporación de diferentes dosis de saponinas.

**Hipótesis de trabajo:**

La incorporación de saponinas con diferentes especies forrajeras produce reducción de población protozoaria y por consiguiente menos elaboración de metano entérico en la fermentación ruminal *in vitro*.

# **CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1. Ganadería en Ecuador**

La ganadería en Ecuador es realizada por varios sectores agrícolas pecuarios, lo que influye en la contaminación del medio ambiente con respecto al cambio climático, presencia de gases de efecto invernadero, afectando la estabilidad segura de la población (Villeras y Montenegro, 2018).

En la cordillera de los andes se encuentra la explotación de ganadería bovina lechera y cárnica ejecutada de forma intensiva y semiintensiva, la obtención de carne de res, se desarrolla contantemente en sistemas intensivos en zonas tropicales o sub-tropicales (Costa, Sierra y Oriente), para disminuir la perdida de energía en el ganado vacuno, en las regiones ecuatorianas existe mayor producción de ganado bovino (Castillo, 2015).

Centralmente los productos principales alcanzados por los rebaños ganaderos son: carne de res, obtención de leche junto con su procedente en mercancías lácteas, queso o yogures. Para la clasificación geográfica de productores de ganado vacuno dentro del Ecuador se inicia con la región andina o sierra con 74% significando la mayor productora, posteriormente con 14% representa la región costa y finalmente en un rango de 18% a 8% en la región Amazónica (FAO, 2018).

En los años 2000 al 2013 se conoció que existían 5 millones de bovinos en promedio, conformadas de razas puras y mestizas utilizadas para producción de carne, leche o doble propósito las cuales son: Holstein, Friessian, Brahman, Cebuina y razas criollas de la zona, aunque en todo el país, se reflejan diferentes razas de bovinos incluidas las razas criollas (Castillo, 2015).

## **1.2. Nutrición y alimentación de bovino**

Alimentar a los animales es una tarea minuciosa, por las actividades que se toma en cuenta para cumplir con las necesidades nutricionales del ganado, inclusive en las materias primas, forrajes o pastos que crecen en fincas de producción, siendo útil la verificación del aporte nutricional para la aplicación de destrezas que ayudarán a conservar dicha materia seca, en tiempos de escasez o bajas precipitaciones ya que ocasionan un desbalance en la dieta, por ello es importante aplicar otras alternativas como son: balanceados, pancas de maíz, incluso realizar ensilajes, heno, entre otras, para evitar pérdidas en la conversión alimenticia o pesos semanales (González y Tapia, 2017).

Es importante evaluar la eficacia y eficiencia de los alimentos por estar relacionados con la productividad y economía de la empresa ganadera, el 50% de la inversión total pertenece a la alimentación del ganado, por lo tanto, los alimentos deben encontrarse en rangos aceptables de la calidad alimenticia (González y Tapia, 2017).

La ganadería en la actualidad no solo se enfoca en la importancia de reducción de costos o mejor conversión alimenticia, si no en dietas que satisfagan al animal nutricionalmente con bajas producciones de gases de efecto invernadero (Díaz, 2017).

Los rumiantes con las dietas ingeridas diariamente emiten del 17 al 37% de gas metano, aunque el científico Johnson asegura que podría existir cambios en la reducción de este gas por el tipo de alimento que ingieren, sin embargo otros estudios muestran resultados variantes en cuanto a la producción de metano, mencionado que algunas materias primas pueden disminuir los gases CH<sub>4</sub>, pero también podrían incrementarlas consecutivamente, un ejemplo claro podría ser los granos de maíz, por generar lípidos estando secos o de igual forma disminuyen las emisiones de metano por menor conversión alimenticia o aumentar de peso en mayor kilogramos de carne (Pasinato *et al.*, 2018).

La calidad de los alimentos con respecto a los pastos no siempre tendrá buenas características para nutrición del animal, por motivos que si un pastizal no presenta un buen manejo durante todo el año, implementando las especies vegetales de la zona y fertilización o riego, no servirá de nada tener pastos de buena calidad, por ello es importante que los pastizales mantengan permanentemente un excelente manejo sin quitar o aminorar la eficacia (Rua-Franco, 2017).

La energía, fibra y proteína que contienen los pastos, servirá para satisfacer las necesidades del bovino en cuanto al requerimiento nutricional que desea para su desarrollo y crecimiento en cuanto a la producción de carne o leche (Nieto *et al.*, 2012).

A continuación se definirá la importancia de ciertos nutrientes para mejorar la capacidad corporal del bovino he interacción con el medio externo, con buen peso corporal; energía: útil para mantener en buen estado físico, fisiológico y anatómico el cuerpo del animal, también una gestación adecuada en las vacas y buena producción, entre los alimentos que aportan energía se encuentra el sorgo, maíz, caña de azúcar, entre otros; proteína: forma los tejidos con buenos músculos, interactúan con anticuerpos para resistir las enfermedades y están presentes en la elaboración de leche, entre los alimentos que se puede encontrar proteínas son las leguminosas como la soya, frejol, girasol, canavalia;

Fibra: ayuda al funcionamiento correcto de la digestibilidad ruminal, con el equilibrio de los ácidos evitará daños digestivos, las fibras aportan grasa en la leche y se pueden encontrar en silos de maíz, sorgo, pasturas, caña de azúcar o praderas con pastos de calidad en especial leguminosas, que aportaran con energía al ganado, varias producciones ganaderas lecheras no usa insumos extras para la obtención de leche, pero otras implementan balanceados en las dietas diarias del animal (Nieto *et al.*, 2012).

### **1.3. Forraje *Moringa oleífera***

Según García (2016), la moringa (*Moringa oleífera Lam.*), concerniente a la familia Moringaceae, es uno de los arbustos forrajeros más reconocido a nivel mundial, por las propiedades curativas y por la alta calidad de proteína que posee, lo cual es muy importante para completar necesidades que requieren los rumiantes (Ramírez, 2016).

Los investigadores consideran el árbol más asombroso creado por Dios, lo cual lo refleja en sus características asombrosas en toda la parte fisiológica de la planta como son: tallo, la raíz, la fruta, las flores y las hojas, además de las semillas por contener (Ramírez, 2016).

Otros continentes lo conoce vulgarmente como: árbol de espárrago, marango, árbol de perlas, árbol de rábano picante, árbol de la vida, árbol de los milagros y moringa, una de sus características fisiológicas ayuda a los ápices de crecimiento aumentar con facilidad en corto tiempo, las condiciones edafoclimáticas que puede adaptarse son en: las regiones tropicales, subtropicales y zonas semiáridas, otra característica favorable es que puede crecer en superficies con escasez hídrica, y se debe realizar un buen manejo agronómico es su fertilización para mejorar y aumentar la producción de su biomasa (García, 2016).

Sus semillas generalmente se las utilizan en las industrias farmacéuticas por poseer características medicinales y nutrientes especiales en su interior, es buena para el procesamiento de agua, como alimento y fertilizante (Martín *et al.*, 2013).

#### **1.3.1. Valor nutricional de *Moringa oleífera***

Según Alvarez-Mena (2017), las hojas de la moringa tienen un porcentaje del 29% de proteínas, este valor es el doble que la leche y es la misma cantidad que posee el huevo, contiene otros nutrientes como es: calcio, hierro y grasa útil para la nutrición del animal.

Según Pilay (2019), muestra que moringa oleífera contiene:

- Proteína cruda 13.92%
- Fibra detergente neutra de 49.55%

- Fibra detergente ácida 33.66%
- Materia seca de 23.02%

#### **1.4. Forraje *Gliricidia sepium***

*Gliricidia sepium* leguminosa forrajera, también conocido como mata ratón, se originó en el norte y sur de América, adaptable en diferentes suelos con pH de 5 a 7.7 y puede crecer desde 1600 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas de 21 a 30<sup>0</sup>C, precipitaciones desde 800 a 2303 mm, crece hasta 15 metros de altura con 40 mm de diámetro , produce en promedio 6201 kilogramos/hectárea/de forraje verde en tiempos de lluvia y en escasez de precipitaciones 800 kilogramo/hectárea/ de forraje verde, cada tres meses de cortes aunque esto dependerá de las condiciones edafoclimáticas del lugar donde esté sembrado dicha especie (Hurtado *et al.*, 2012).

*Gliricidia sepium* contiene moléculas de nitrógeno en “nitratos y nitritos”, pero los que afectan a las proteínas de citocromo oxidasa son los ácidos cianhídrico provocando la ausencia de oxígeno en los tejidos, ante esto los más vulnerables que sufren problemas de salud son los monogástricos, mientras que los rumiantes son más resistentes (Hurtado *et al.*, 2012).

Es recomendable que mata ratón esté únicamente en las dietas de rumiantes por contener alto porcentaje en proteína con 18 a 28%, distribuidos de la siguiente forma: hojas 14.1 a 25% y tallos tiernos con 65% otorgando una digestibilidad del 65% usada por contener altas cantidad de aminoácidos esenciales “menos los azufrados”, rica en nutrientes y con baja en toxicidad, convirtiéndola útil para la alimentación del ganado bovino (Cuervo-Jiménez *et al.*, 2013).

##### **1.4.1. Valor nutricional de *Gliricidia sepium***

Es un forraje que contiene proteína bruta de 26.5% aprovechando hasta el cincuenta por ciento de su capacidad nutricional (Ortiz-González *et al.*, 2014).

Gonzales (2019) platea que *Gliricidia sepium* contiene:

- Proteína cruda de 23%
- Cenizas de 8.92%
- Fibra detergente neutra de 45%
- Fibra detergente ácida 27.65%
- Materia seca de 33%

## **1.5. Forraje *Morus alba***

Es un forraje útil en la alimentación del ganado, es originario de América y Australia, actualmente China, India y Brasil posee gran cantidad de este forraje, además como existe producciones de larvas de seda la mayoría de países cuenta con grandes hectáreas de *Morus alba*, en el continente Asiático como: China, Japón y India en Europa están: Francia y España; para un buen desarrollo y crecimiento necesita temperaturas de 26 a 30°C, temperaturas menores de 12°C las plantas entraran en senescencia, se adapta a suelos livianos con poca arcilla y arena y pH neutros aunque podría crecer en pH de 5 a 8, su reproducción es asexual con estacas de 25 cm de largo, contiene un alto porcentaje de palatabilidad del ganado, además de ello una digestibilidad de 69 a 79% (Rodríguez, 2010).

### **1.5.1. Valor nutricional de *Morus alba***

Forraje óptico para la alimentación del ganado, por poseer altos niveles de nutrición y usos en balanceados (Saavedra-Montañez, 2018).

Según Boschini (2001), muestra que contiene los siguientes nutrientes:

- Proteína cruda de 20%
- Cenizas de 13.44%
- Fibra detergente neutra de 33.9%
- Fibra detergente ácida 35.03%
- Materia seca de 28.7%

## **1.6. Efecto de la ganadería en el medio Ambiente**

Las actividades pecuarias ganaderas y agrícolas son las principales causantes de gases de efecto invernadero como son: dióxido de carbono, metano y óxido nitroso estos gases dañan el ecosistema y el medio ambiente con el deterioro de la capa de ozono de la atmósfera terrestre, ocasionando cambios climáticos (Villeras y Montenegro, 2018).

En la actualidad se presentan dos gases de efecto invernadero de gran impacto que afecta al entorno ambiental como es el metano y dióxido de carbono, conociendo que el CO<sub>2</sub> predomina en grandes cantidades en el calentamiento global sin embargo con el incremento de producciones ganaderas bovinas el metano se exhibe al exterior con la contaminación y destrucción del entorno, llegando a pensar que en un futuro el metano puede ser el gas dominante de los gases de efecto invernaderos (Hristov *et al.*, 2013).

Se exhiben datos donde señala que las cantidades de metano por el ganado bovino es siete a ocho veces mayores que los otros animales domésticos como: ovinos y caprinos (Román-Ponce y Hernández-Medrano, 2016).

Los principales animales domésticos que ocasionan la producción de metano CH<sub>4</sub> es el ganado bovino, por los procesos de fermentación que realiza en el rumen, produciendo casi 2.2 millones de toneladas al año, existen otros factores que promueven el aumento de metano global como son: incandescencia de biomasa, excretas acumuladas, actividades agrícolas y pantanos naturales (Ungerfeld *et al.*, 2018).

En la actualidad la población ganadera de países desarrollados, mejora y realiza diferentes dietas alimenticias, con materia prima obteniendo como resultado el incremento energético y disminución de metano a nivel mundial (Mendoza Martínez y Velasco, 2016)

La biodiversidad de Ecuador es muy variante por los diferentes estados climáticos que presentan las regiones y por la geografía existente, esto ayuda a la producción de productos agrícolas pecuarios que aportan en la mejora de energía renovable, no obstante, los cultivos de arroz, quema de sabanas y suelos agrícolas también causan gas de efecto invernadero (Haro-Reyes *et al.*, 2018).

#### **1.6.1. Gases de efecto invernadero**

Los gases de efecto invernaderos provocan daño al suelo, aire y océanos, entre los cuales se presenta el óxido nitroso, dióxido de carbono, hexafluoruro de azufre y gas metano, provocados por la agricultura, quema de combustible, empresas procesadoras de alimentos y cosméticos, sin embargo el gas metano es producido por los rumiantes en el proceso de fermentación de los alimentos ingeridos, especialmente en el proceso de digestión, pero para realizar este proceso el bovino pierde energía y aumenta la producción de metano y por ende los gases de efecto invernadero (ONU, 2019).

La elaboración de metano inicia desde el tipo de alimento, cantidad de alimento consumido por día, cantidad de fibra, digestibilidad, contextura y volumen del alimento. Las estrategias que se han desarrollado para atenuar las emisiones de metano entérico, son dietas equilibradas y la administración de materias primas las mismas que sirven e para la evaluación de digestibilidad, esta actividad es la más usada en los investigadores por motivos que es menos compleja y es simple de usar (Bonilla Cárdenas y Lemus Flores, 2012).

### **1.6.2. Gasto energético por producción de gases de efecto invernadero**

En Ecuador, las producciones grandes y pequeñas de sistemas ganaderos de bovino se realizan con la alimentación de pastos y forrajes que contienen una baja calidad nutricional, lo que conlleva a pérdidas de energía por gases de efecto invernadero como son: CO<sub>2</sub> “dióxido de carbono” y CH<sub>4</sub> “metano” que representa a un promedio del 2 al 12% de desgaste energético por la elaboración de metano y dióxido de carbono, esto ocurre porque los forrajes o pastos contienen alto contenido en lignina y fibra (Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

### **1.7. Fermentación**

Es la acción metabólica que realizan los microorganismos en la digestión glandular; existen diferencias digestivas entre animales mono gástricos como porcino, herbívoros y poligástricos “rumiantes”, para la absorción de nutrientes que ocurre normalmente en el intestino delgado y estómago con la interacción de enzimas creadas por el organismo de los mamíferos llamada “digestión auto-enzimática”, mientras que en los rumiantes se realiza hidrólisis enzimática, descomposición de la materia orgánica con bacterias, protozoos de origen microbiano predominantes en la fermentación denominada “digestión aloenzimática” (Lier y Regueiro, 2008).

Los rumiantes presentan una digestión anaeróbica lenta compleja, ocurriendo en dos sitios diferentes del ciego-colon y retículo-rumen elaborando la fermentación pre gástrica, donde se aprovechan los nutrientes a diferencia de la digestión glandular o post-gástrica (Lier and Regueiro, 2008).

### **1.8. Composición de los alimentos**

Los alimentos contendrán diferentes cantidades de agua y materia seca, esto depende del tipo de suministro que ingiere el animal, la materia orgánica presenta nutrientes útiles para el aprovechamiento en reproducción, producción de carne y leche. Los nutrientes aprovechados son: lípidos, carbohidratos y proteínas los mismo que ayuda al desarrollo musculatura, reserva de energía o grasa, manteniendo un buen funcionamiento fisiológico, existen otros compuestos que no son asimilados por el animal, pero útiles para la digestión (Stritzler and Rabotnikof, 2019).

### **1.9. Proceso de digestión en el retículo-rumen**

Los alimentos son moléculas grandes que ingiere el animal por medio de la boca, para la obtención de nutrientes debe pasar por diferentes procesos para convertirse en moléculas

simples y llegar a la digestión gastrointestinal “glandular”; los alimentos son masticados, sin embargo, aún no satisface los requerimientos para la absorción de nutrientes por ello debe de pasar del retículo al rumen que está formado por epitelio escamoso y ocupa el 79.99% del estómago del rumiante (Ramírez-Malavé y Chávez-García, 2019).

Los bovinos o animales rumiantes utilizan la rumia para la descomposición de los suministros, inician ingiriendo pasto o materia seca, utilizando la lengua, dientes para llevarla al rumen, cuando está lleno se prepara para la re-masticación que dura de 60 a 70 segundos en la desintegración de cada porción hasta llega al omaso y abomaso; comen durante 4 a 8 horas al día por motivo que los suministros son bajos en valor nutricional que provee poca energía (Lier y Regueiro, 2008).

Los productos que se obtienen al final de la actividad realizada en el retículo-rumen son: gas “metano”, nutrientes, proteína microbiana y estiércol; empieza cuando los alimentos ingeridos por la boca con: agua, saliva y materia orgánica pasan a ser re-masticado consecutivamente hasta convertirse en partículas pequeñas, interactuando enzimas, microorganismos “protozoos, hongos y bacterias” micro bióticos adaptados a pH neutros en el líquido ruminal, para la fermentación de la materia orgánica con constantes movimientos llegando al omaso y abomaso, en este proceso los gases expulsado por la boca llegan hasta 600 litros por día y los nutrientes o minerales se absorbe por la sangre (García Carrasco, 2016).

### **1.10. Población microbiana ruminal**

Existen tres grupos que denominan la población ruminal y son: bacterias, hongos y protozoos, cada uno se encuentran distribuidos en diferentes áreas del rumen anexadas a la pared, flotando en el líquido ruminal y unidos a partículas de los alimentos; constan diferentes clases de bacterias que interactúan con la materia orgánica en la descomposición pueden ser “hidrófobos, hidrófilos” al momento de digerir sustratos como: celulosa, almidón, fibra, lactato, azúcares, pectinas, grasas, producen metanos en la fermentación de azúcares simples y lactato (García Carrasco, 2016).

Se encuentra  $10^{10}$ - $10^{11}$  células por milímetro de líquido ruminal, son pequeñas y más abundantes que los protozoos, no obstante se encuentra  $10^5$ - $10^6$  células protozoarias por milímetro de líquido ruminal, pesando el 2 por ciento del contenido, aportando con el 61% de los productos de la fermentación (Rotger, 2004), se encuentran pocas especies

filiadas y más ciliadas, junto con los hongos se conoce que no son importantes para la sobrevivencia de los rumiantes (Lier and Regueiro, 2008).

### **1.11. Fermentación ruminal entérica**

Es el proceso que realizan todos los animales herbívoros en la digestión, con ayuda de microorganismo presentes en el sistema digestivo, los carbohidratos consumidos por animal serán transformados en partículas menos complejas o más pequeñas con ayuda de los microorganismos presentes en el estómago, mediante este proceso inicia la elaboración de metano, pero la cantidad está en dependencia del tipo de alimento, edad del animal, cantidad de fibra del pasto, peso del animal, propósito de crianza del animal “carne o leche” y la cantidad o calidad que se coloca en la alimentación (Zúñiga González, 2016).

La fermentación ayuda en la absorción de nutrientes los que será adquiridos en el crecimiento y desarrollo del animal, gracias a los microorganismos que descomponen los alimentos, en el rumen existen diferentes organismos que trabajan en simbiosis, también en antagonismo dando como resultado una ecología grande, los microorganismos aumentan o se movilizan por el tipo de alimento que ingieren los animales para la transformación de moléculas grandes a pequeñas, como son las bacterias o protozoos metanogénicos, estos microorganismos fabrican metano entérico mediante la fermentación, aunque las bacterias tienen poco espacio en la población ruminal son importantes para disminuir el nitrógeno del rumen (Finster y Berra, 2011).

#### **1.11.1. PH Ruminal**

Es un factor importante en alimentación porque se visualiza física y químicamente en la absorción nutricional y es fundamentalmente empleada en la digestión ruminal (Poma-Chávez, 2018).

El pH cambia dependiendo el tipo de alimento que consumirá el animal, ubicándose en un rango de 5.2 a 7.7 (Campos-Montiel et al., 2018), cuando los rumiantes son alimentados con concentrado el pH disminuirá a diferencia con la alimentación de forrajes, la fermentación será más rápida con la dieta de balanceado, ya que el poder tampón disminuye con el consumo de forraje, cuando el animal es alimentado con altas cantidades de carbohidratos los ácidos lácticos aumentan y por ende el pH disminuye (Cardona-Iglesias *et al.*, 2017).

### **1.11.2. Elaboración de metano entérico**

Cuando los alimentos son ingeridos por el bovino, inicia la fermentación ruminal provocando la presencia de metano, lo que hará que el animal pierda energía por estar en constante actividad en la elaboración de este gas (Macías-Muñoz, 2019), también ocurrirá cambios en el ambiente por la cantidad de metano emitido al aire o también llamado gas de efecto invernadero lo que provocará daños al ecosistema o medio ambiente con el desbalance de temperatura climáticas o lluvias ácidas (Bonilla Cárdenas y Lemus Flores, 2012).

Los procesos de fermentación pueden ser anaeróbica y se da en el rumen de los bovinos, donde se encuentra una gran población microbiana trabajando para la descomposición de la dieta alimenticia y para la asimilación de nutrientes del huésped, por ello es importante mantener bloques nutricionales de diferentes materias primas para evitar altas cantidades de metano (Bonilla-Sandí et al., 2020).

### **1.11.3. Producción de microorganismos metanogénicos**

En la elaboración de metano, los diferentes organismos vivos que se encuentran en el sistema digestivo llamados microorganismo entérico o metanogénicos, necesitan estar en la fermentación ruminal donde se realiza la elaboración de gas metano; iniciaran tomando dióxido de carbono en la respiración anaeróbica y con el uso de  $H_2$  como aceptor de electrones terminales, se formará  $CH_4$  “metano” (Reyes-Aguilera, 2017).

Otros factores que ayuda a la formación de metano son: azufre, óxido nitroso y óxido de azufre que se unirán en condiciones anaeróbicas, sin presencia de luz mejorando la velocidad en la descomposición de materia orgánica, llegando al inicio de biogénesis de metano, con los organismos del reino Archaea que se subdivide en diferentes microorganismos procariotas (Bonilla Cárdenas and Lemus Flores, 2012).

Los principales compuestos en la fermentación son: dióxido de carbono y di- hidrógeno lo que hará que el pH del rumen sea adecuado para la fermentación de los nutrientes y que los microorganismos actúen (Carmona *et al.*, 2005).

### **1.11.4. Población de protozoos**

Los protozoarios son microorganismos unicelulares (eucariotas), correspondientes al reino Protista, que tienen cilios como medio de locomoción, el tamaño va a variar en ancho de 10 – 200  $\mu m$  y largo 15 – 25  $\mu m$ , lo que muestra que serán más grande que las

baterías “tamaño de bacterias de 1-10  $\mu\text{m}$ ”, sin embargo cuando las partículas de alimento pasan al abomaso la población de protozoos será menor que las bacterias ya que estas se incrustaran en las partículas por el tamaño que tienen (Romero Huelva, 2012).

Los protozoos en el nitrógeno microbiano ruminal representan 4.9 y 12.7%, en el duodeno 5.9 y 11.9%, ayudan a las proteínas con el 20%, sus reproducciones será lenta o rápida en dependencia de los cambios de dietas que tendrá el animal, los protozoos más comunes son Holotricos y Entodiniomorfos (Castillo-Lopez y Domínguez, 2019).

Los Holotricos son importantes al momento de regular las concentraciones de azúcar, tomadas de dietas que contenían azúcares fáciles de digerir, evitando la transformación de acidosis, inicia tomando la sacarosa soluble y la ubica en los polisacáridos de reserva (Galindo et al., 2017).

Los protozoos forman parte compleja del hábitat microbiano del rumen, ayuda en la fermentación de materia orgánica o alimentos ingeridos por el bovino, pero aún existen criterios sobre la actividad que realiza con respecto a la absorción de nutrientes o mejoría de la digestión, no obstante las investigaciones realizadas en la verificación de la actividad protozoaria señala que estos microorganismos mejoran la digestibilidad en el rumen y otros muestran que no ocurren cambios significativos con presencia o ausencia de los protozoos (Veloz-Vargas y Barros-Rodríguez, 2020).

Delante de todas estas controversias mencionadas se puede mostrar en la (Tabla 1) que los protozoos cumplen una función en la fermentación, con la nivelación de los nutrientes y ayuda en la fermentación estable, no existiendo irregularidad en la fermentación con las diferentes rangos alimenticios, horarios alimenticios o detenciones de las dietas que pueden provocar desniveles del pH del rumen (Orskov, 1982).

**Tabla 1.** Principales protozoos en el rumen con sustratos de preferencias “continua”

| Sustratos fermentados |           |            |         |          |          |              |
|-----------------------|-----------|------------|---------|----------|----------|--------------|
| Familia               | Subclase  | Género     | Almidón | azúcares | celulosa | hemicelulosa |
| Isotrichidae          | Holotrica | Isotricha  | X       | X        |          |              |
|                       |           | Dasytricha | X       | X        |          |              |

**Tabla 1.** Continuación

| Familia          | Subclase       | Género       | Almidón | azúcares | celulosa | hemicelulosa |
|------------------|----------------|--------------|---------|----------|----------|--------------|
|                  |                | Diplodinium  | X       |          | X        | X            |
| Ophryoscolecidae | Entodiniomorfa | Entodinium   | X       | X        |          | X            |
|                  |                | Epidinium    | X       |          | X        | X            |
|                  |                | Ophryoscolex | X       |          | X        | X            |

Hungate, (1966)

### 1.12. Producción de gas

Los gases emitidos por las empresas ganaderas son: dióxido de carbono, óxido nitroso y metano (Ocampo *et al.*, 2011), principalmente por las diferentes dietas empleadas en los ovinos emiten 50 litros de metano por día, ocasionando la muerte o ausencia de la flora y fauna, el metano también es expulsado por las excretas, eructo y el aire que es espirado por el animal; todo el proceso ocurre en la digestibilidad del animal con la utilización de energía (Bonilla Cárdenas y Lemus Flores, 2012).

Se perderá energía por la fermentación que producirá metano o gases de efecto invernadero, otras causas que se presentan al exterior del ambiente con respecto a la producción de metano es la calidad del alimento, componentes de fibra del pasto, tiempo de digestibilidad, tipo de animal, tamaño del animal, procesos realizado antes de que el animal sea alimentado, cantidad de la dieta ingerida al día (Barros-Rodríguez *et al.*, 2017).

Los factores mencionados anteriormente alcanzan un total de 50 al 60% en la elaboración de metano, donde el 37% corresponde a la fermentación entérica y el 23% en la descomposición de excretas expulsadas por el animal (Dolores-Carro *et al.*, 2019).

Estas cantidades preocupan debido al calentamiento global por las emisiones de metano, ya que es 21 veces más que el dióxido de carbono en la atracción de la radiación solar y contiene un promedio de vida hacia la atmósfera de 10 a 20 años, el dióxido de carbono de 50 a 200 años y el óxido nitroso de 100 a 150 años (Bonilla-Sandí *et al.*, 2020).

Analizando las posibilidades en la disminución metano con el poco tiempo que se emplea para este proceso, inicia en la absorción de carbono que se produce en la fermentación

aeróbica de los rumiantes en el proceso de la fotosíntesis en el momento la conversión de dióxido de carbono a oxígeno eliminando las cantidades de carbono, como también la expulsión de metano entérico por medio de la transformación de CO<sub>2</sub> (FAO, 2013).

Por ello se toma en cuenta los factores alimenticios como son: tipo y volumen del alimento que serán digeridos en el omaso, permitiendo el traslado de partículas pequeñas, estado del rumen en la fermentación, cantidad de fibra o digestibilidad del alimento (Haro *et al.*, 2018).

Sin embargo, las cantidades de metano que expulsa el animal están estrechamente relacionadas con la cantidad de energía que gasta el animal “peso metabólico” ((Herranz Ramírez, 2018).

Por tal razón se investiga alternativas en la disminución de metano entérico, como es implementación de alimentos de calidad en las dietas del bovino, reducción de partículas de forraje para la disminución de horas de rumia y forrajes con alta digestibilidad, esto es llamado, buen manejo técnico en la dieta del animal (Bonilla Cárdenas y Lemus Flores, 2012).

Lo que causará una fermentación entérica con bajas poblaciones de protozoarios, microorganismos metanógenos disminuirán significativamente y los iones de hidrógeno serán desviados para que las poblaciones metano génicas no se unan a la fermentación, las investigaciones aseguran que por cada 1000 gramos de forraje seco se obtendrá 21 gramos de metano entérico expulsado a la atmósfera, concluyendo que la alimentación está relacionada con la cantidad de metano elaborada en la fermentación (Bonilla Cárdenas y Lemus Flores, 2012).

### **1.13. Simulación de obtención de gas *in vitro***

Existen diferentes formas para evaluar los gases elaborados en la fermentación del rumiante como es la de incubar la materia seca con líquido ruminal con temperaturas de 39 grados centígrados por cuarenta y ocho horas, posteriormente se coloca pepsina con solución ácida para asemejarse a la digestión gástrica, se tendrá como resultado imitar la degradación de los forrajes efectuada en el rumen este método es creado por Tilley y Terry en el año 1963 perfeccionada en el año 1991 por Theodorou, otra técnica usada es la de Menke en el año 1979 donde los alimentos son incubados con temperaturas de 39 grados centígrados, tomando los datos en diferentes tiempos de incubación; las materias

que provocarán el aumento en el ritmo de producción de gases son los más degradables, entonces estas herramientas *in vitro* son muy útiles y económicas para determinar la digestión de los alimentos y degradabilidad ruminal, aunque se necesita de la evaluación in-vivo para demostrar los resultados obtenidos en los análisis (Dolores-Carro, 2019).

#### **1.14. Estrategias para disminuir metano**

Las contaminaciones aumentan, por los gases de efecto invernadero debido que las granjas de grandes empresas pecuarias y pequeñas o medianos productores de bovinos aumenta por la demanda de alimentos, por tal motivo se está realizando investigaciones para obtener estrategias que no generen altos costos y que sean accesibles para todos los trabajadores ganaderos; los cuales sería la mejora genética de razas criollas con otra especie mejorada, mejor manejo en la nutrición, buen manejo sanitario “inyecciones o vacunas controladoras de enfermedades de la zona” (FAO, 2013).

Otras actividades que se pueden emplear es la incorporación de taninos, saponinas o moléculas solubles en lípidos, manteniendo al animal saludable y sin daños fisiológicos ya que contribuirá en la reducción de gases de efecto invernadero (FAO, 2013).

##### **1.14.1. Manejo de nutrición**

Las diferentes dietas que se elaboran en la alimentación del ganado pueden ser de baja calidad alimenticia lo que provoca el aumento de metano “CH<sub>4</sub>”, ocasionado desgaste energético los rumiantes con 2 al 12% provocando daños al animal y medio ambiente (Bonilla Cárdenas y Lemus Flores, 2012).

Las estadísticas muestran que un rumiante expulsa de 300 a 600 litros de metano al año, elaborados por los organismos metanogénicos, donde 80'000.000 toneladas al año de metano se elaborarán considerando el ganado bovino adulto, lo que define que este gas es el principal fenómeno con un 18%, que afecta el medio ambiente y la atmósfera, conocidos como gas de efecto invernadero; la expulsiones de este gas se dan por eructos que estará en dependencia de las horas que el animal estará realizando la rumia o por el recto, por ello se conoce que los alimentos o la cantidad que es impartida al animal está relacionada con la cantidad de metano entérico (Sosa *et al.*, 2007).

##### **1.14.2. Calidad de alimentos**

En los alimentos que recibirá el animal diariamente, se considera la digestibilidad del forraje, por motivos que si un pasto o forraje es sumamente digerible las cantidades de

metano bajarán, dando como resultado menos gases de efecto invernadero, por motivo que el metano disminuye si el rumiante es alimentado con forrajes de calidad y con buenas digestibilidades con respecto a la unidad animal (Alfaro y Muñoz, 2012).

La alimentación es un factor que interactúa con la emisión de metano por ello se recomienda manejar una dieta balanceada, ejemplo si el ensilaje de maíz sustituye, a los ensilajes de pastos esta actuara en la disminución de CH<sub>4</sub>, otro ejemplo en la alimentación es la incorporación de leguminosas, por ser menos fibrosas y ayudando en la fijación de nitrógeno natural lo que beneficiará al medio ambiente (Hristov *et al.*, 2013).

Las leguminosas en los lotes de crianza como: alfalfa, frijol, soya, canavalia, entre otros, ayudará en la mejoría de las poblaciones de forrajes de poaceae en climas cálidos o templados, los mismos que servirán en la alimentación del ganado, sin embargo, se diseñará controles agrícolas para comparar N<sub>2</sub>O con los fertilizantes nitrogenado, presentes en las empresas dedicadas a ventas de agroquímicos (Hristov *et al.*, 2013).

Los ensilajes aplicados a la dieta del vacuno deberán ser eficientes, para mantener el forraje verde con buen estado nutricional, para poder disminuir los gases de efecto invernadero (Ungerfeld *et al.*, 2018).

### **1.14.3. Incorporación de saponinas**

Los glucósidos están compuestos por glúcidos, que generalmente se encuentran en los vegetales o animales, para la protección de algún patógeno o para la reserva de energía, entre los glucósidos encontramos las saponinas contiene un alto peso molecular, interactuando con el colesterol de la membrana de los protozoos, dando como resultado la lisis celular (Guo *et al.*, 2008).

Investigaciones realizadas muestran que la presencia de saponinas producirá un alto potencial en el flujo de proteínas presentes en el rumen, con la unión de dietas utilizadas en el ganado, mejorando así las funciones nutritiva y menos gases *in vitro*, no obstante este proceso ocurrirá en dependencia de la dosis, naturaleza o la acción, para realizar los cambios o efectos en la fermentación entérica en contra de los fragmentos anti-microbianos (Barros-Rodríguez *et al.*, 2014).

La reducción de metano se debe especialmente con la presencia de saponinas, por los efectos que causa a los protozoos “productores de hidrógeno y bacterias, causando lisis

celular, produciendo menos fermentación en el rumen, por la escasez de hidrógeno en la elaboración de metanogénesis (Abreu et al., 2003).

Al existir menos microorganismos productores de metano en el rumen, la energía que no será gastada en la metanogénesis, será aprovechada en el animal, para realizar otros procesos productivos (Martínez Loperena *et al.*, 2011 y Barros-Rodríguez *et al.*, 2014).

Existen otros complejos metabólicos que ayudan en mejorar la fermentación ruminal, como es el tanino, que permite el traslado de proteínas en el tracto gastrointestinal junto con las saponinas y forma mejor rendimiento en las producciones ganaderas (Rojas-López y Valencia-Trujillo, 2019).

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación del ensayo

La siguiente investigación se desarrolló en la provincia de Tungurahua, cantón Cevallos, con temperaturas promedio de 13.2°C y precipitaciones 50 mm/año en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en el laboratorio de ruminología (Figura 1), ubicada a 20 Km al sur de Ambato con una altitud de 2850 m.s.n.m. cuyas coordenadas geográficas son: 01° 22´ 0.2” de latitud Sur y 78° 36´ 22” de longitud Oeste.



**Figura 1.** Ubicación del ensayo

### 2.2. Materiales y Equipos

#### 2.2.1. Materiales biológicos

El análisis en la producción de gas metano entérico se utilizaron seis toros fistulados con peso de  $413 \pm 34$  kg, para la obtención del líquido ruminal.

#### 2.2.2. Materiales de laboratorio

- Balanza de peso electrónica digital de precisión
- Cuchara espátula inoxidable
- Frascos ámbar de inyección de 100 ml
- Tamiz 1 mm

- Estufa
- Jeringa de 40 ml
- Monitor portátil multigas: GX-6000
- Transductor de presión DELTA OHM modelo DO 9704 (Delta OHM, Padova, Italia)
- Phmetro de sobremesa
- Cámara de Neubauer
- Micropipeta
- Tips o puntas de pipeta
- Cubre y porta objetos
- Microscopio óptico
- Micro tubo
- Agua destilada

### **2.2.3. Materiales o reactivos para elaboración de saliva artificial**

- NaHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, (Solución buffer)
- Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> (Solución macro- minerales)
- Solución reductora, micro- minerales, indicador

### **2.2.4. Materiales vegetales**

- *Moringa oleífera*
- *Gliricidia sepium*
- *Morus alba*
- Saponinas

### **2.2.5. Materiales de campo**

- Cuaderno
- Fundas transparentes
- Baldes
- Sogas
- Esferos
- Guantes quirúrgicos
- Overol
- Botas

## 2.3. Diseño experimental y tratamientos

### 2.3.1. Tratamientos

Se realizó la investigación con nueve tratamientos y seis repeticiones, caracterizada por tres clases de materia seca como es: *Moringa oleífera*, *Morus alba* y *Gliricidia sepium*, desdoblada con la incorporación de dosis de saponinas al 2 y 4%, con un testigo, para evaluar la cantidad de metano y la población de protozoos presentes en la fermentación ruminal *in vitro* después de 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, posteriormente a la incubación de materia seca.

**Tabla 2.** Tratamientos de la investigación

| Nº Tratamiento        | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  |
|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Materia seca          | MG | MG | MG | GS | GS | GS | MR | MR | MR |
| Dosis saponina%/mg MS | 0  | 2  | 4  | 0  | 2  | 4  | 0  | 2  | 4  |

MG: Moringa GS: Gliricidia MR: Morera

**Tabla 3.** Grados libertad del experimento

| Fuente de variación | Fórmula                    | Grados libertad (gl) |
|---------------------|----------------------------|----------------------|
| Tratamiento         | (t-1)                      | 8                    |
| Repeticiones        | (r-1)                      | 5                    |
| Error               | (t-1)- (r-1)               | 3                    |
| Total               | (t-1)+ (r-1)+ (t-1)- (r-1) | 16                   |

### 2.3.2. Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) en condiciones controladas, *in vitro* utilizando la técnica de (Theodorou *et al.*, 1994) y realizado por (Galindo *et al.*, 2011), con 9 tratamientos y 6 repeticiones para toda la investigación tenido un total de 54 unidades experimentales para la evaluación metano y 54 unidades experimentales para el estudio de población de protozoos dando como resultado un total de 108 unidades experimentales.

### 2.3.3. Manejo del experimento

- **Preparación para la evaluación de metano.-** Se utilizaron 54 botellas de 100 mL, para incubar las muestras de forrajes de 0.500 a 0.515 mg de materia seca como: moringa, morera y gliricidia, anexando las dosis de saponina al 0, 2(1 mg/mg MS) y 4%(2 mg/mg MS), se unirán con líquido ruminal; y posteriormente colocadas en estufa a temperaturas de 40°C por 30 minutos, para después ser sometidas a baño maría y determinar el volumen, presión y cantidad emitida de CH<sub>4</sub> “metano entérico” transcurridas las horas de incubación de la evaluación, según (Posada *et al.*, 2006) indica que este procedimiento se realiza para la simulación de rumen de la fermentación.
- **Preparación para contabilización de protozoos y medición de pH ruminal. -** Se prepararon 54 botellas de 100 mL con forrajes de estudio moringa, morera y gliricidia en polvo en rangos de 0.500-0.515 mg, con las respectivas dosis de saponinas de 0, 2(1 mg) y 4%(2 mg) /mg MS, incluido el líquido ruminal, las mismas que fueron selladas.
- **Obtención de líquido ruminal. -** Se utilizó 6 toros fistulados en ayuna para la extracción del líquido ruminal, ubicado en el saco dorsal del rumen (Chávez-García *et al.*, 2018).  
las recolecciones se realizaron en la mañana 7:30 am, inicialmente se retiraron las cánulas para introducir las manos y aislar el líquido ruminal en distintas fundas plásticas transparentes de los 6 bovinos, las muestras fueron conservadas herméticamente hasta ser llevadas al laboratorio y posteriormente filtradas con tamices de diámetro de 1 mm, al culminar se colocó 18 mL del líquido ruminal en el experimento (Canul-Solis *et al.*, 2019).
- **Obtención de saliva artificial.-** Según Apráez-Guerrero *et al.* (2016) muestra que para la preparación de saliva artificial se necesita diferentes soluciones como son: solución buffer formada por NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de sodio 42 g) y NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de amonio 4.8 gr); solución de macro-minerales compuesta por: Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato de sodio 11.34 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato de potasio monobásico 7.44) y MgSO<sub>2</sub> (Sulfato de magnesio 0.72 g); fueron disueltas en 6 litros de agua destilada con la incorporación de micro-minerales y con solución reductora “cisteína” 1.5 g. Posteriormente se realizó baño maría con aplicación de dióxido de carbono por 5 horas, hasta obtener una coloración rosa palo, consecutivamente

se tomó 42 ml de saliva artificial por 0.500 miligramos de materia seca, en cada unidad experimental “42 ml/0,500 mg MS.

- **Medida de volumen, presión y cantidad emitida de CH<sub>4</sub> (metano entérico).** - La evaluación se realizó después de: 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de valoración próxima a la incubación de materia seca. Con un transductor de presión DELTA OHM modelo DO 9704 (Delta OHM, Padova, Italia) se tomaron los datos de presión, colocando una jeringa de 40 ml dentro del frasco sin tocar la mezcla de fermentación, después se retiró con cuidado para ser llevada al monitor portátil multigas: modelo GX-6000, donde se visualizó la cantidad de metano y dióxido de carbono, este procedimiento se empleó en todos los tratamientos con las respectivas horas de evaluación y de acuerdo con (Apráez-Guerrero *et al.*, 2016).
- **Contabilización de protozoos y medición de pH.** - Se ejecutó en dos horarios 12 y 24 horas consecutivamente a la incubación. Para medir el pH se utilizó el phmetro de sobremesa, en la contabilización protozoaria se manejó la cámara de neubauer, iniciando con la extracción de muestra incubadas, para el análisis con la pipeta regulada a un 1 ml que fueron colocadas en micro-tubos; para la conservación de los protozoarios se aplicó una gota de formol y azul metileno al 0.03% en la muestra para luego llevarlo al microscopio óptico (x10) con la cámara de neubauer, acorde a la metodología de (Ogimoto y Imai, 1981) y realizado por (Manotoa-Chicaiza, 2016).

#### **2.3.4. Variables evaluativas**

Las variables a evaluar fueron las siguientes.

##### **2.3.4.1. Variable independiente: Horas de incubación de la materia seca**

Las muestras de forraje moringa, morera y gliricidia fueron incubadas y posteriormente evaluadas de la siguiente forma: 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, para verificar la cantidad de metano emitido y la población protozoaria.

##### **2.3.4.2. Variable dependiente: Producción de gas metano, población de protozoos en la cinética de fermentación.**

La fermentación permite determinar la degradación de la materia seca ingerida por los animales, según Posada et al. (2006) enseña que la presión y el volumen obtenido de los datos experimentales, están relacionados para visualizar ecuaciones por medio de la R<sup>2</sup>, que servirán en el ajuste del volumen de gas metano.

### **2.3.5. Análisis estadístico**

Las variables serán analizadas en el programa GraphPad prisma 7, con la comparación de medias, mediante la prueba de Tukey.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Cinética de fermentación de materia seca *in vitro* de *Moringa oleífera*

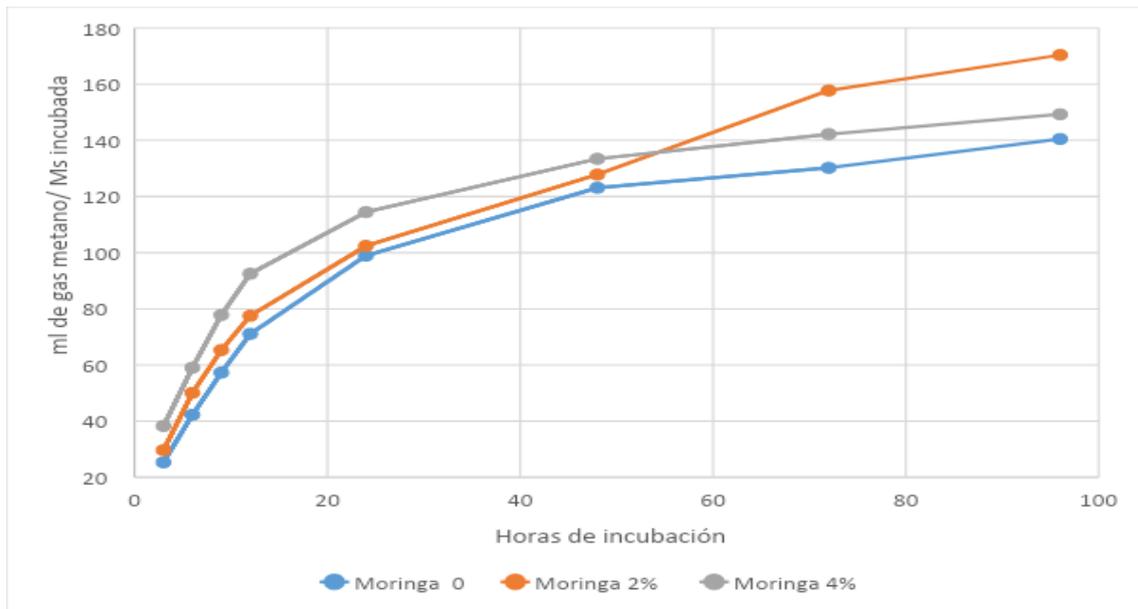
En la tabla 4 se reflejan datos de mililitros de metano, por cada miligramo de materia seca incubada de los tratamientos, uno, dos y tres obtenidos en la fermentación ruminal del forraje *Moringa oleífera*, con las respectivas dosis de saponinas al 2(1 mg/mg MS) y 4%(2 mg/mg MS), con diferentes horas de fermentación.

**Tabla 4.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos 1, 2 y 3 de la materia seca “moringa” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%.

| ml de gas metano/ mg Ms incubada |                 |                  |                  |         |       |
|----------------------------------|-----------------|------------------|------------------|---------|-------|
| T (h)                            | Materia seca    |                  |                  | p-valor | CV%   |
|                                  | T1 Moringa<br>0 | T2 Moringa<br>2% | T3 Moringa<br>4% |         |       |
| 3                                | 25.36           | 29.68            | 38.29            | <0.05   | 12.58 |
| 6                                | 42.28           | 50.09            | 59.06            | <0.05   | 13.75 |
| 9                                | 57.30           | 65.33            | 77.83            | <0.05   | 13.49 |
| 12                               | 71.10           | 77.54            | 92.52            | <0.05   | 13.39 |
| 24                               | 98.95           | 102.41           | 114.45           | >0.05   | 14.31 |
| 48                               | 123.12          | 127.80           | 133.43           | >0.05   | 16.95 |
| 72                               | 130.22          | 157.76           | 142.58           | <0.05   | 10.94 |
| 96                               | 145.96          | 170.39           | 149.29           | <0.05   | 10.28 |

T (h): Tiempo de Incubación en horas; T1 Moringa 0: materia seca sin presencia de saponinas; T2 Moringa 2%: materia seca con 1mg de saponina; T3 Moringa 4%: materia seca con 2mg de saponina; p-valor: letras iguales no difieren estadísticamente ( $p>0.05$ ).

La cinética de fermentación en la materia seca moringa, en las horas de incubación 3, 6, 9 y 12, con respecto a las dosis de saponinas fueron significativa al ( $p<0.05$ ), mientras que en la hora 24 y 48 no difieren estadísticamente en ( $p>0.05$ ) y posteriormente en las horas 72 y 96 existe diferencia significativa respecto a ( $p<0.05$ ), lo que muestra que no se encontró efectos significativos con la aplicación de saponinas al 2 y 4%, puesto que los resultados exponen altas cantidades de gas metano en los tratamientos 2 y 3, sin embargo al inicio de la incubación de la materia seca, la producción de metano estuvo en rangos de 25 – 38 ml de gas/mg de MS incubada y finalizando con 140 a 149.38 ml de gas/mg de MS, mostrando que no hubo significancia en las horas de fermentación con respecto a las dosis de saponinas y horas de fermentación de la materia seca incubada.



**Figura 2.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos 1, 2 y 3 de la materia seca “moringa” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%

La figura dos muestra la interacción del pasto *Moringa oleífera* con la cantidad de metano emitido en las horas incubación de la materia seca los cuales son: 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96, con las diferentes dosis de saponina al 2 y 4% por cada miligramo de forraje, los tres tratamientos 1, 2 y 3 no muestran significancia en los miligramos de metano, pero si se demuestra la cinética de la fermentación por la interacción de los organismos metanogénicos.

Según Barros-Rodríguez et al. (2014) enseña que se mostrará cambios significativos en la producción de gas metano, con dosis adecuadas de saponinas en las dietas utilizadas para el ganado, provocando mejoras en el flujo de proteínas del rumen, por tal motivos no se visualizaron cambios en la disminución de metano entérico ya que las cantidades de saponinas no eran las adecuadas con el forraje *Moringa oleífera*, trabajos realizados por Doreau et al. (2011) y Carmona et al. (2005) con el fruto de *Sapindus* o saponina aseguraron la reducción de metano entérico. Sin embargo, Abreu et al. (2003) mostró que con la utilización del 1.2% de saponina, no reflejaron datos significativos con respecto a la reducción de gas metano, Guo et al. (2008), asegura que las saponinas son metabolitos que interactúan con los microorganismos metanógenos ocasionado la lisis celular, pero con las concentraciones adecuadas se pueden visualizar datos positivos en cuanto a la reducción de metano entérico.

### 3.2. Cinética de fermentación de materia seca *in vitro* de *Gliricidia sepium*

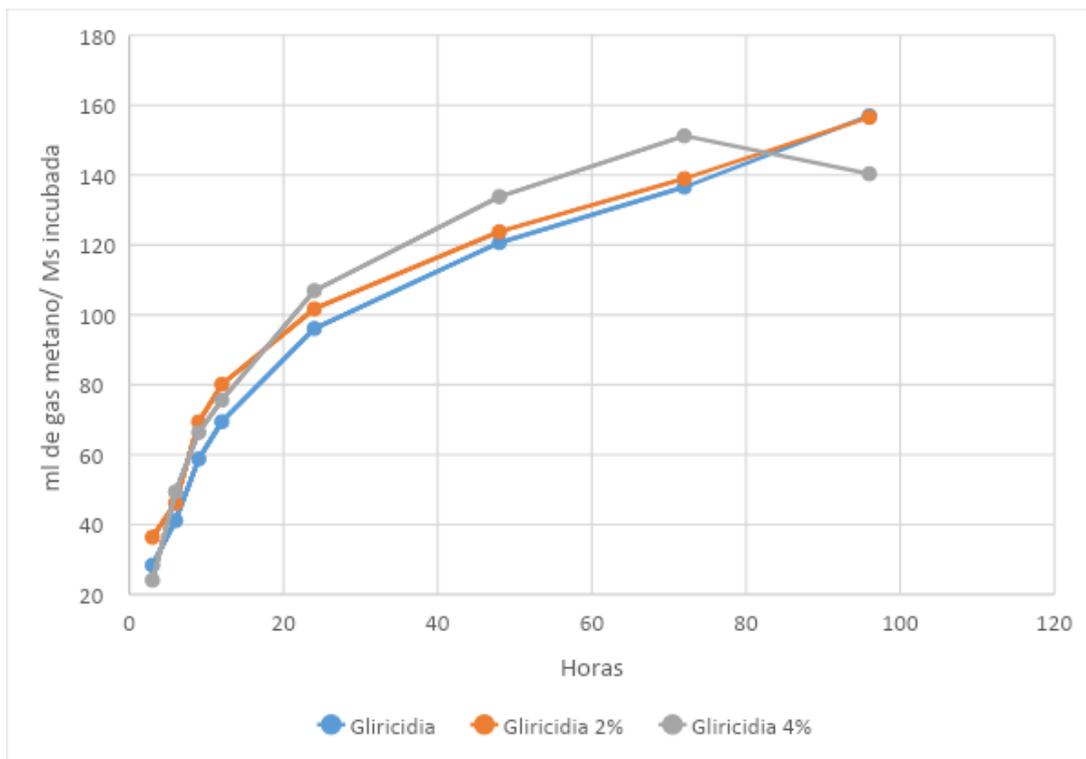
En la tabla 5 se reflejan los datos de mililitros de metano, por cada miligramo de materia seca incubada de los tratamientos, cuatro, cinco y seis obtenidos en la fermentación ruminal del forraje *Gliricidia sepium*, con las respectivas dosis de saponinas al 2(1 mg/mg MS) y 4%(2 mg/mg MS), con diferentes horas de fermentación.

**Tabla 5.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos 4, 5 y 6 de la materia seca “gliricidia” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%.

| ml de gas metano/ Ms incubada |               |               |               |         |       |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|-------|
| T (h)                         | Materia seca  |               |               | p-valor | CV%   |
|                               | T4 Gliricidia | T5 Gliricidia | T6 Gliricidia |         |       |
| 3                             | 28.38         | 36.39         | 24.08         | >0.05   | 12.91 |
| 6                             | 41.13         | 49.37         | 46.14         | >0.05   | 14.38 |
| 9                             | 58.77         | 69.39         | 66.35         | >0.05   | 13.73 |
| 12                            | 69.42         | 80.13         | 75.60         | >0.05   | 15.55 |
| 24                            | 96.09         | 106.94        | 101.72        | >0.05   | 13.52 |
| 48                            | 120.66        | 133.88        | 123.78        | >0.05   | 13.56 |
| 72                            | 136.57        | 151.22        | 138.96        | >0.05   | 15.43 |
| 96                            | 156.96        | 156.54        | 140.37        | >0.05   | 8.96  |

T (h): Tiempo de Incubación en horas; T4 Gliricidia 0: materia seca sin presencia de saponinas; T5 Gliricidia 2%: materia seca con 1mg de saponina; T6 Gliricidia 4%: materia seca con 2mg de saponina; p-valor: letras iguales no difieren estadísticamente ( $p>0.05$ ).

En la tabla 5 la cinética de fermentación con la materia seca gliricidia, en las horas de incubación 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 no muestra significancia ( $p>0.05$ ) con respecto a las dosis de saponinas, aunque se visualiza menor cantidad de metano en el tratamiento 6, después de tres horas de incubación de la materia seca fue 24.08 ml gas/mg MS, siendo diferente al tratamiento 4 y 5 con volumen de 41.13 a 46.14 ml gas/mg MS; no obstante las próximas horas de incubación, los tratamiento 4 y 5 presentaron menor cantidad de gas metano a diferencia del tratamiento seis, pero finalmente en la hora 96 de la fermentación ruminal, el tratamiento 6 “gliricidia al 4% de saponinas” mostró menos producción de gas metano, aunque los resultados no son significativos ( $p>0.05$ ).



**Figura 3.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos 4, 5 y 6 de la materia seca “gliricidia” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%

La figura tres muestra la reacción que tuvo el pasto *Gliricidia sepium* en las horas 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 de fermentación *in vitro* con respecto a la cantidad de metano emitido en la incubación de la materia seca, se visualizó que a mayor tiempo de fermentación en horas, la cantidad de metano entérico aumenta consecutivamente con presencia o ausencia de saponina al 2 y 4%, pero a la hora 96 existe un decrecimiento en tratamiento seis por motivos que las saponinas actúan de manera positiva en disminuir las cantidades de microorganismos metanógenos con la reducción de gas metano que estará en el ambiente.

Según Cárdenas (2012), señala que el gas metano se forma en la fermentación de los alimentos ingeridos por los rumiantes, provocando pérdida de energía en la fabricación de gas, que podría ser utilizada para aumentar la producción de carne o leche, también Bonilla y Flores, (2012) mencionan que habrá cambios negativos en el ambiente o ecosistema por desequilibrios de temperatura a causa de las lluvias ácidas ocasionadas por los gases de efecto invernadero “metano”. La dosis de saponina empleada en el tratamiento 6 no realizó cambios a gran escala, pero FAO, (2013) aconseja para la reducción de los gases de efecto invernadero se podría implementar saponinas en las dietas del animal, sin afectar la salud o la fisiología del rumiante.

### 3.3. Cinética de fermentación de materia seca *in vitro* de *Morus alba*

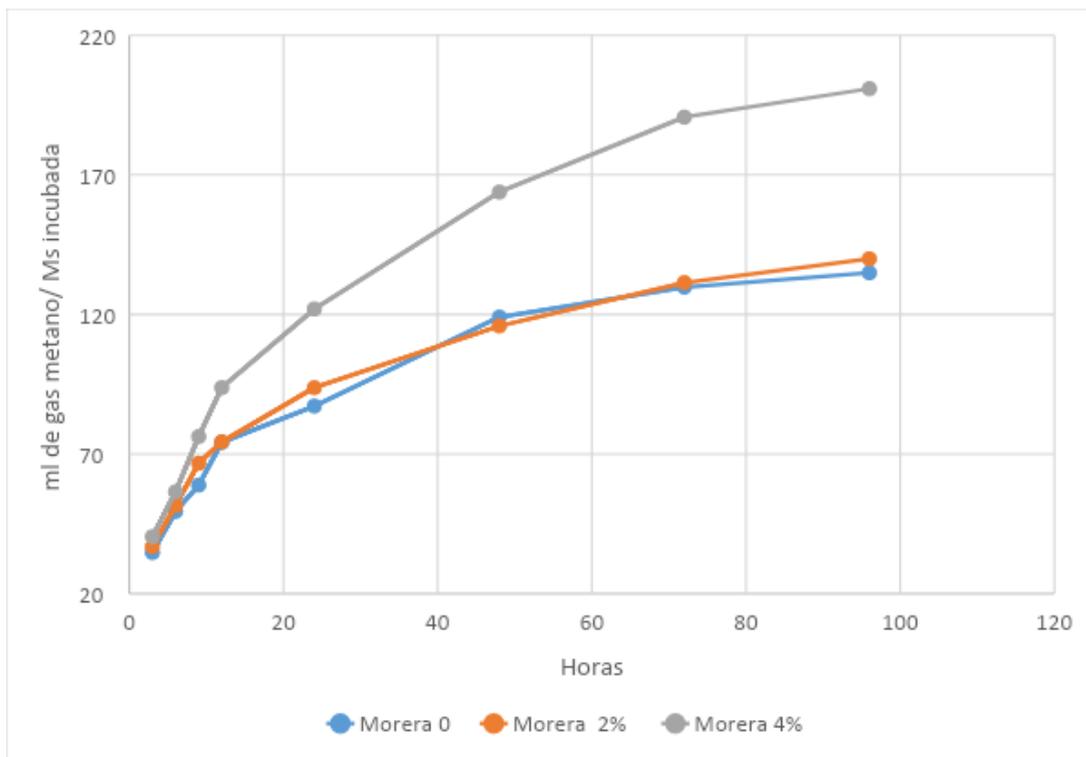
En la tabla 6 se reflejan los datos de mililitros de metano, por cada miligramo de materia seca incubada de los tratamientos: siete, ocho y nueve obtenidos en la fermentación ruminal del forraje *Morus alba*, con las respectivas dosis de saponinas al 2(1 mg/mg MS) y 4%(2 mg/mg MS), con diferentes horas de fermentación.

**Tabla 6.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos 7, 8 y 9 de la materia seca “morera” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%.

| ml de gas metano/ Ms incubada |                |                 |                 |         |       |
|-------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------|-------|
| T (h)                         | Materia seca   |                 |                 | p-valor | CV %  |
|                               | T7 Morera<br>0 | T8 Morera<br>2% | T9 Morera<br>4% |         |       |
| 3                             | 34.71          | 36.84           | 40.39           | >0.05   | 13.8  |
| 6                             | 49.45          | 51.51           | 56.48           | >0.05   | 13.79 |
| 9                             | 58.86          | 66.69           | 76.24           | <0.05   | 15.13 |
| 12                            | 74.19          | 74.37           | 93.78           | <0.05   | 11.19 |
| 24                            | 87.18          | 93.77           | 121.98          | <0.05   | 14.15 |
| 48                            | 119.04         | 115.89          | 163.81          | <0.05   | 13.75 |
| 72                            | 131.39         | 129.78          | 190.67          | <0.05   | 14.12 |
| 96                            | 134.92         | 139.92          | 200.86          | <0.05   | 16.07 |

T (h): Tiempo de Incubación en horas; T7 Morera 0: materia seca sin saponinas; T8 Morera 2%: materia seca con 1mg de saponina; T9 Morera 4%: materia seca con 2mg de saponina; p-valor: letras iguales no difieren estadísticamente ( $p > 0.05$ ).

La cinética de fermentación con la materia seca de la morera, en las horas de incubación 3 y seis no mostraron significancia con respecto a ( $p > 0.05$ ) como lo muestra la tabla 6, mientras en las horas 9, 12, 24, 48, 72, y 96 después de la incubación de la materia seca en la fermentación ruminal *in vitro*, fueron significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las dosis de saponinas en el tratamiento 8 y 9, presentando mayor producción de gas metano a diferencia del tratamiento 7 sin saponinas en la fermentación, sin embargo analizando las medias detalladamente se visualiza en la hora 12 y 48 del tratamiento 8 con 2% de saponina, menos producción de metano pero estos resultados no mostraron significancia al transcurrir las horas de incubación al final del análisis, ya que el tratamiento 7 presentó menos cantidad de metano sin la aplicación de saponinas.



**Figura 4.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos 7, 8 y 9 de la materia seca “morera” con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%

En la figura cuatro se muestra la reacción que tuvo el pasto *Morus alba* en 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación *in vitro* con respecto a la cantidad de metano emitido en la incubación de la materia seca con las dosis de saponina del 2 y 4%, donde interactúa la cinética de fermentación con las horas transcurridas y el aumento consecutivo de gas metano, por los microorganismos metanogénicos que trabajan en el rumen para la fabricación de metano, también se refleja los efectos que ocurrió con la incorporación de saponinas al 4% dando como resultado el aumento de CH<sub>4</sub>.

La FAO, (2013) asegura que existe menos cantidad de metano entérico, hacia la atmósfera con el uso de saponinas por la interacción que realiza con los microorganismos metanogénicos con respecto a la reducción de los mismos, Barros-Rodríguez et al. (2014), demuestran que las dosis adecuadas de los metabolitos secundarios “saponinas” reducirán las cantidades de gas de metano, pero se deberá realizar las investigaciones adecuadas con la dieta a implementar, según Alfaro y Muñoz (2012), muestra que los alimentos sumamente digestibles y pocos fibrosos implementados en la dieta diaria del animal bajara las cantidades de gas metano, y también con la aplicaciones de forrajes de calidad; la materia seca *Morus alba* no reaccionó positivamente en la reducción de metano entérico por que las cantidades de saponinas no fueron las adecuadas.

### 3.4. Cinética de fermentación de materia seca *in vitro* y población de protozoos

En la tabla 7 se reflejan los datos de mililitros de metano, por cada miligramo de materia seca incubada de los nueve tratamientos empleados en la investigación, obtenidos de la fermentación ruminal de los forrajes; *Moringa oleífera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba*, con las respectivas dosis de saponinas al 2(1 mg/mg MS) y 4%(2 mg/mg MS), en diferentes horas de fermentación, con la respectiva población de protozoos después de 12 y 24 horas de fermentación de las materias secas.

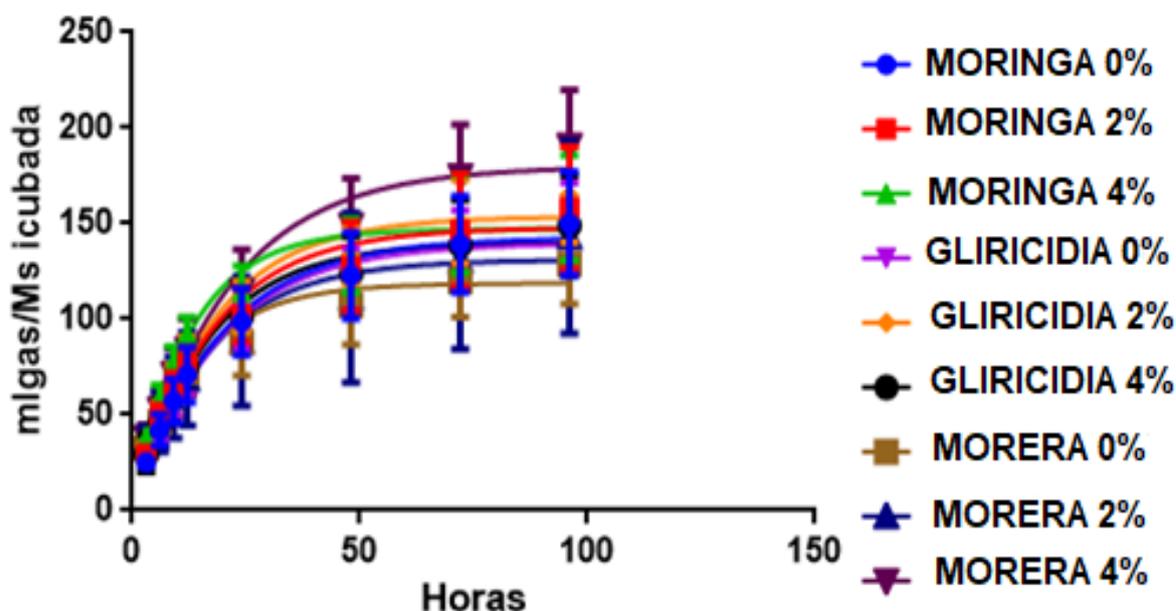
**Tabla 7.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* “todos los tratamientos” con dosis de saponina al 2 y 4% y población protozoaria

| ml de gas metano/ mg Ms incubada   |              |            |            |            |            |            |            |            |            |             |           |
|------------------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----------|
| T<br>(h)                           | Materia seca |            |            |            |            |            |            |            |            | p-<br>valor | CV<br>%   |
|                                    | T1           | T2         | T3         | T4         | T5         | T6         | T7         | T8         | T9         |             |           |
| 3                                  | 25.36        | 29.68      | 38.29      | 28.38      | 36.39      | 24.08      | 34.71      | 36.84      | 40.39      | <0.05       | 13.2<br>2 |
| 6                                  | 42.28        | 50.09      | 59.06      | 41.13      | 49.37      | 46.14      | 49.45      | 51.51      | 56.48      | <0.05       | 13.9<br>5 |
| 9                                  | 57.30        | 65.33      | 77.83      | 58.77      | 69.39      | 66.35      | 58.86      | 66.69      | 76.24      | <0.05       | 14.1      |
| 12                                 | 71.10        | 77.54      | 92.52      | 69.42      | 80.13      | 75.60      | 74.19      | 74.37      | 93.78      | <0.05       | 13.7<br>1 |
| 24                                 | 98.95        | 102.4<br>1 | 114.4<br>5 | 96.09      | 106.9<br>4 | 101.7<br>2 | 87.18      | 93.77      | 121.9<br>8 | <0.05       | 13.9<br>9 |
| 48                                 | 123.1<br>2   | 127.8<br>0 | 133.4<br>3 | 120.6<br>6 | 133.8<br>3 | 123.7<br>8 | 119.0<br>4 | 115.8<br>9 | 163.8<br>1 | <0.05       | 14.9<br>8 |
| 72                                 | 130.2<br>2   | 157.7<br>6 | 142.5<br>8 | 136.5<br>7 | 151.2<br>2 | 138.9<br>6 | 131.3<br>9 | 129.7<br>8 | 190.6<br>7 | <0.05       | 13.7<br>3 |
| 96                                 | 145.9<br>6   | 170.3<br>9 | 149.2<br>9 | 156.9<br>6 | 156.5<br>4 | 140.3<br>7 | 134.9<br>2 | 139.9<br>2 | 200.8<br>6 | <0.05       | 12        |
| Número de protozoos/Mg Ms incubada |              |            |            |            |            |            |            |            |            |             |           |
| T<br>(h)                           | Materia seca |            |            |            |            |            |            |            |            | p-<br>valor | CV<br>%   |
|                                    | T1           | T2         | T3         | T4         | T5         | T6         | T7         | T8         | T9         |             |           |
| 12                                 | 9            | 9          | 12         | 10         | 9          | 12         | 13         | 8          | 10         | <0.05       | 11.4<br>3 |
| 24                                 | 27           | 10         | 14         | 15         | 19         | 8          | 8          | 9          | 12         | <0.06       | 8.34      |

T (h): Tiempo de Incubación en horas; T1 Moringa 0: materia seca sin saponinas; T2 Moringa 2%: materia seca con 1mg de saponina; T3 Moringa 4%: materia seca con 2mg de saponina; T4 Gliricidia 0: materia seca sin saponinas; T5 Gliricidia 2%: materia seca con 1mg de saponina; T6 Gliricidia 4%: materia seca con 2mg de saponina; T7 Morera 0: materia seca sin saponinas; T8 Morera 2%: materia seca con 1mg de saponina; T9 Morera 4%: materia seca con 2mg de saponina; p-valor: letras iguales no difieren estadísticamente ( $p>0.05$ ).

En la tabla 7 la cinética de fermentación actuó de diferentes formas con las materias secas: moringa, gliricidia y morera con respecto a las horas de incubación 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, y 96 mostrando significancia entre todos los tratamientos en relación al ( $p<0.05$ ), el tratamiento 6 “gliricidia al 4% de saponinas” y tratamiento 1 “moringa sin dosis de saponinas” no mostraron diferencia significativa ( $p>0.05$ ), siendo las que elaboraron menos cantidad de metano después de tres horas de incubación de materia seca, anexo está información con la población protozoaria se visualiza, en el transcurso de 24 horas que el tratamiento 6 muestra menos población protozoaria con la interacción de saponinas al 4% “2 mg”, y el tratamiento 1 después 12 horas los protozoos son bajos a diferencia de los otros tratamientos; mientras que el tratamiento 3 “moringa al 4% de saponinas” y el tratamiento 9 “morera al 4% de saponina” en la hora 3 de fermentación, con significancia ( $p<0.05$ ), reflejaron cantidades altas de gas metano los mismo que muestran un aumento de protozoarios al transcurrir 24 horas de fermentación *in vitro*.

No obstante los datos de metano entérico se articulan muy variantes en todos los tratamientos al transcurrir las horas de fermentación de las materias secas, sin embargo finalizando con la evaluación en la hora 96 se expresa que el tratamiento 6 “gliricidia con 4% de saponinas”, tratamiento 7 “morera sin saponina” y tratamiento 8 “morera con 2% de saponina” no mostraron significancia con respecto al ( $p>0.05$ ), los mismo que produjeron menos cantidad de metano entérico ruminal y población protozoaria con respecto a los otros tratamientos, concordando con (Fernández-Mayer 2020 y Torres et al. 2020), enseña que las saponinas son metabolitos secundarios encontrados en las plantas, que participan en la modificación de la fermentación ruminal, disminuyendo la población o el crecimiento de los protozoos, dando como resultado el mejoramiento de la producción del animal.



**Figura 5.** Cinética de fermentación ruminal *in vitro* todos los tratamientos de materia seca, con diferentes dosis de saponina al 0, 2 y 4%

En la figura cinco reflejan las reacciones que tuvo la cinética de fermentación con respecto a los tratamientos con diferentes dosis de saponina y materias secas; *Moringa oleífera*, *Gliricidia sepium*, *Morus alba*, al transcurrir las horas las cantidades de metano aumenta secuencialmente con todos los pastos, según Pasinato et al. (2018), menciona que las emisiones de gas metano provocado por los rumiantes aumentan consecutivamente, en dependencia del tipo de dieta que se emplea, sin embargo podrían existir cambios positivos en disminuir las cantidades de metano en relación a la conversión alimenticia, transformando el alimento en kg de carne y disminuyendo el tiempo de fermentación ruminal, es por ello que las materias secas moringa, morera y gliricidia, no mostraron las mismas respuestas en cuanto a las emisiones de gas metano entérico al transcurrir las horas de fermentación *in vitro*.

En el análisis se mostró que el tratamiento 6 “gliricidia 4% de saponinas” después de tres horas de incubación de la materia, produjo menor cantidad de metano. Secuencialmente los valores más bajos son: moringa sin dosis de saponinas, gliricidia sin dosis de saponina y morera sin dosis de saponina, los otros tratamientos reflejan datos altos de gas metano, esto se debe a las cantidades de fibra que contienen las materias secas, concordando con Watts (2019), enseña que los alimentos que contienen más fibra aumenta las cantidades de metano; por lo tanto, los resultados muestran que *Morus alba* produce menos cantidad

de metano entérico por contener cantidades de fibra inferiores a *Gliricidia sepium* y *Moringa oleifera* según (Boschini, 2001 y Pilay-Malavé, 2019)

Otro factor que influye en la pérdida metano entérico, es la presencia de saponinas por provocar un lisis celular en los protozoos que son encargados en la elaboración del mismo, según Carmona et al. (2005), a pesar de ello no existieron datos significantes en cuanto a los mililitros de metano emitidos por cada miligramos de materia seca, al transcurrir las horas de fermentación; culminando la investigación en la hora 96 de incubación de materias secas, *Gliricidia sepium* con el 4% de saponina presentó datos menores de metano entérico, a diferencia de los otros tratamientos pero estos resultados no son relevantes para determinar soluciones para disminuir con los gases de efecto invernadero “gas metano”, por motivos que las dosis incorporadas no fueron las adecuadas según Barros-Rodríguez et al. (2014).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- La incorporación de forrajes: *Moringa oleífera*, *Gliricidia sepium* y *Morus alba* en unión de saponinas, mostraron que la población protozoaria puede aumentar o disminuir al transcurrir las horas de fermentación ruminal, y estará en dependencia de la cantidad de fibra y compuesto orgánico “saponinas” que contenga la dieta diaria del rumiante; por tal motivo los resultados expusieron que los tratamientos 6, 7 y 8 después de 24 horas de fermentación *in vitro* con dosis de saponinas, ocasionaron lisis celular y dificultad de reproducción en los protozoos.
- Las materias secas incorporadas con saponinas al 2 y 4% no reflejaron datos significativos en cuanto a la disminución de la población protozoaria y por ende en la elaboración de metano entérico, por motivo que las dosis de saponinas no fueron las adecuadas para cada materia seca: moringa, morera y gliricidia, sin embargo analizando las posibilidades de disminuir el gas de efecto invernadero “gas metano” se encontró, que el factor que más influye en cuanto el aumento del gas metano es la cantidad de fibra que podría contener un pasto, por ello *Morus alba* incorporado en las dietas de los animales producirá menos cantidades de metano entérico, mientras que *Gliricidia sepium* está en segundo plano y por último *Moringa oleífera* que presentan relación con la población protozoaria ya que son los encargados de la fermentación entérica en los organismos de los rumiantes.

### Recomendaciones

- Realizar la investigación *in situ* en los animales de las parroquias de la provincia Santa Elena, en los diferentes rumiantes existentes caprinos y bovinos
- Evaluar la conversión alimenticia, con la aplicación de saponinas en las dietas los rumiantes de Santa Elena

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, A., Carulla, J., Kreuzer, M., Lascano, C., Díaz, T., Cano, A., Hess, H. (2003) 'Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semi purificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis in vitro en un sistema RUSITEC', *Revista Colombiana ciencias pecuarias*, 16(2), pp.147–154.

Alfaro, M., Muñoz, C. (2012) INIA. Chile: Instituto de investigaciones agropecuaria. Ganadería y gases de efecto invernadero 4.

Alvarez-Mena, A.B. (2017) *Valor Nutricional de la Moringa oleífera. Mito o Realidad Sistematización de experiencias prácticas de investigación e intervención*. Ingeniería en Alimentos. Colegio de Ciencias e Ingenierías. Universidad San Francisco de Quito,

Apráez-Guerrero, J.E., Delgado-Jurado, D., Solarte-Portilla, C, (2016) 'Evaluación In vitro de la producción de metano en variedades de pastos neozelandeses del altiplano de Nariño. *Revista Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), pp. 90–105. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2016.10.2.8>

Avila-Serrano, N.Y., López-Garrido, S.J., Galicia-Jiménez, M.M., González-Crespo, G. de J., Camacho-Escobar, M.A., Avila-Serrano, N.Y., López-Garrido, S.J., Galicia-Jiménez, M.M., González-Crespo, G. de J., Camacho-Escobar, M.A. (2020) 'Efecto de la incorporación de arbóreas a dietas de *Cynodon nlemfuensis* durante la fermentación ruminal in vitro' *Terra Latinoam Scielo*, 38(2), pp. 403–412. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.618>

Barros-Rodríguez, M., Oña-Rodríguez, J., Mera-Andrade, R., Artieda-Rojas, J., Curay-Quispe, S., Avilés-Esquivel, D., Solorio-Sánchez, J., Guishca-Cunuhay, C. (2017) 'Degradación ruminal de dietas a base de biomasa pos-cosecha de *amaranthus cruentus*: efecto sobre los protozoos del rumen y producción de gas in vitro, Perú', *Revista de Investigación Veterinaria*, 28(4), pp. 812–821. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/13931>.

Barros-Rodríguez, M., Sandoval-Castro, C., Solorio-Sánchez, J., Sarmiento-Franco, L., Rojas-Herrera, Athol, Klieve. (2014) 'Leucaena leucocephala en nutrición de rumiantes, Mérida-México' *Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(2), pp. 173–183. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93931761003.pdf>.

Bonilla Cárdenas, J.A., Lemus Flores, C., 2012. 'Enteric methane emission by ruminants and its contribution to global climate change, México', *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(2), pp. 215–246.

Bonilla-Sandí, D.J., Noboa-Jiménez, L., Portuguez-Molina, V. (2020) 'Metanogénesis microbiana en animales poligástricos'. *Revista Nutrición Animal Tropical*, 14(1), pp. 36–49.

Boschini, Carlos. (2001) 'Degradabilidad in situ de la materia seca, proteína y fibra del forraje de morera (*Morus alba*)', *Revista Agronomía Mesoamericana*, 12(1), pp. 79–87.

Campos-Montiel, R.G., Razo-Rodríguez, Ó.E. del, Almaraz-Buendía, I., Ramírez-Bribiesca, E., Soriano-Robles, R., Salinas-Martínez, J.A., Arias-Margarito, L., González-Muñoz, S.S. (2018) 'Bioconversión de desperdicios vegetales a biogás a partir de microorganismos ruminales', *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(1), pp. 149–155. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.01.13>.

Canul-Solis, J.R., Piñeiro-Vazquez, A.T., Chay-Canul, A.J., Castillo-Sánchez, L.E., Alayón-Gamboa, J.A., Ayala-Burgos, A.J., Aguilar-Pérez, C.F., Pedraza-Beltran, P., Castelán-Ortega, O.A., Ku-Vera, J.C. (2019) 'Efecto de la fuente y concentración de saponinas en la producción in vitro y ruminal de metano', *Archivo de Zootecnia*, 68(263), pp. 362–369. <https://doi.org/10.21071/az.v68i263.4194>.

Cárdenas, J.A.B., Flores, C.L. (2012) 'Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático'. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(2), pp. 215–246. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265624467007>.

Cardona-Iglesias, J.L., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. (2017) 'Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos', *Revista Agronomía Mesoamericana*, 28(1), pp. 273–288. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21466>.

Carmona, J.C., Bolívar, D., Giraldo, L. (2005) 'El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo' *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), pp. 49-63. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v18n1/v18n1a06.pdf>.

Castillo, M. (2015) *Análisis de la Productividad y Competitividad de la Ganadería de Carne en el Litoral Ecuatoriano*. Resultados de Consultoría para RIMISP – Parte I. Serie Documentos de Trabajo N° 144. Grupo de Trabajo: Desarrollo con Cohesión Territorial. Programa: Impactos a Gran Escala. Rimisp, Santiago, Chile. [http://www.rimisp.org/wp-content/files\\_mf/1437665697GanaderiaCarne\\_DocResultados\\_Final\\_editado.pdf](http://www.rimisp.org/wp-content/files_mf/1437665697GanaderiaCarne_DocResultados_Final_editado.pdf).

Castillo-Lopez, E., Dominguez, M.G. (2019) 'Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana', *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*, 10(1), pp. 60-64. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4547>.

Chávez-García, D., Acosta-Lozano, N., Varas-Aguillón, J., Macías-Muñoz, A., Pilay-Malave, M., Ramírez-Malave, C., Vera-Vera, J. (2018). 'Técnicas quirúrgicas para ruminotomía con fistulación ruminal en cabras'. *Revista Científica Tecnológica UPSE*, 5(2), pp. 89–94. <https://doi.org/10.26423/rctu.v5i2.426>.

Cuervo-Jiménez, A., Narváez-Solarte, W., Hahnvon-Hessberg, C. (2013) 'Características forrajeras de la especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Stend, Fabaceae', Universidad de Caldas-Colombia', *Boletín científico centro de historia natural*, 17(1), pp. 33-45. <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v17n1/v17n1a03.pdf>.

Díaz, Fernando. (2017) 'Alimentación proteica en rumiantes', *Nutrinews la revista de nutrición animal*, 3(1), pp. 93–95. <https://nutricionanimal.info/alimentacion-proteica-rumiantes/>.

Dolores-Carro, M. (2019) La fermentación ruminal y digestión: medida in vitro *Nutrinews*. Disponible en: <https://nutricionanimal.info/fermentacion-ruminal-digestion-medida-in-vitro/>. Consultado: 12/7/20.

Dolores-Carro, M., Evan, T., González, J. (2019) Emisiones de metano en los animales rumiantes: influencia de la dieta. Departamento de Producción Agraria, ESTIAAB, Universidad Politécnica de Madrid, Nutrición 4.

Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., Morgavi, D.P. (2011) 'Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants', *INRAE Productions Animales*, 24(5), pp. 461–474. <https://productions-animales.org/article/view/3278>.

FAO. (2018) *Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura: La FAO y el ordeño presentan una alianza estratégica por una agricultura sostenible en el marco de la agenda 2030 | FAO en Ecuador*. Disponible en: <http://www.fao.org/ecuador/noticias/detail-events/es/c/1166586/>. Consultado: 12/2/20.

FAO. (2013) *FAO - Noticias: Gran potencial para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero de la ganadería*. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/198166/icode/>. Consultado: 12/7/20.

Fernández-Mayer, A. (2020). *Saponinas una sustancia química muy poco valorada*. Disponible en: <https://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/saponinas.pdf>. Consultado: 8/12/20.

Finster, L., Berra, G. (2011). *Ganadería: a mejor producción, menos GEI*. Disponible en:

<http://www.produccion-animal.com.ar/sustentabilidad/126-Ganaderia.pdf>. Consultado: 12/3/20.

Galindo, J., Elías, A., Muñoz, E., Marrero, Y., González, N., Sosa, A. (2017) 'Activadores ruminales, aspectos generales y sus ventajas en la alimentación de animales rumiantes', *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, 51(1), pp. 11–23.

Galindo, J., González, N., Sosa, A., Ruiz, T., Torres, V., Aldana, A.I., Díaz, H., Moreira, O. (2011) 'Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) gray (Botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones in vitro' *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(1), pp. 33–37.

García Carrasco, D. (2016) *Aspectos generales sobre el rumen y su fisiología*. Disponible en: <https://www.ganaderia.com/destacado/Aspectos-generales-sobre-el-rumen-y-su-fisiologia>. Consultado en: 12/3/20.

García, Indira. (2016) *Desempeño productivo de *Moringa oleifera* (lam) y su efecto sobre la dinámica ruminal en ovinos de pelo*. Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias Manizales, Universidad de Caldas.

Gonzales, K. (2019) *Uso De *Gliricidia sepium* (matarraton) para la alimentación de rumiantes*. Disponible en: <https://infopastosyforrajes.com/suplementacion/uso-de-gliricidia-sepium-matarraton-para-la-alimentacion-de-rumiantes/>. Consultado: 2/2/21.

González, V., Tapia, M., 2017. *Manual bovino de carne* Primera edición., Villarroel, D.: Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile.

Guo, Y.Q., Liu, J.-X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., McSweeney, C.S., (2008) 'Efecto de la saponina del té sobre la metanogénesis, la estructura de la comunidad microbiana y la expresión del gen *mcrA*, en cultivos de microorganismos del rumen', *Letters in applied microbiology*, 47(5), pp. 421–426. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02459.x>.

Haro, A.N., Evan, M.D., González. (2018) *Cambios en la dieta para reducir los gases contaminantes de los rumiantes*. Disponible en: <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Cambios-en-la-dieta-para-reducir-los-gases-contaminantes-de-los-rumiantes>. Consultado 2/3/21.

Haro-Reyes, J., Gómez-Bravo, C., Rodríguez-Iturralde, L., Garzón-Prado, J.P, (2018). *Mitigación de emisiones provenientes de la ganadería en la región andina* Tercera edición., GMC Digital S.A.C., Lima-Perú.

(Herranz Ramírez, C. (2018) *Estimación de las emisiones de metano por fermentación entérica del ganado bovino en la hacienda Guatiquila ubicada en la Vereda Veracruz, Cumaral-meta*. Ingeniería ambiental, Universidad Santo Tomas.

Hristov, A.N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J. & Oosting, S., 2013. *Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera – Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO2*. Editado por Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson y Harinder P.S. Makkar. Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177. FAO, Roma, Italia.

Hungate, R., 1966. *El rumen y sus microbios* Primera. edición., Academic Press.

Hurtado, D.I., Nocua, S., Narváez-Solarte, W., Vargas-Sánchez, J.E. (2012) 'Valor nutricional de la morera (*Morus sp.*), matarratón (*Gliricidia sepium*), pasto indio (*Panicum máximum*) y arboloco (*Montanoa quadrangularis*) en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus*)', *Revista veterinaria zootecnia*, 6(1), pp.56-65.

Lier, E., Regueiro, M. (2008) *Repartido digestión en retículo rumen en la Universidad de la república*. Uruguay: departamento de producción animal y pasturas curso de anatomía y fisiología animal.

Macías-Muñoz, C.-A. (2019) *Digestibilidad fecal en caprinos criollos alimentados con moringa; Moringa oleifera Lam., como base forrajera de dieta integrales*. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Manotoa-Chicaiza, S.P. (2016) *Capacidad de defaunación ruminal y mitigación de gases de efecto invernadero: efecto de leguminosas forrajeras arbóreas y arbustivas*. Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad técnica de Ambato.

Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E., Puls, J. (2013) 'Potenciales aplicaciones de Moringa oleifera. Una revisión crítica. Pastos Forrajes', *Revista Scielo*, 36(2), pp. 137–149.

Martínez Loperena, R., Castelan Ortega, O., Ronquillo, M., Flores, J.G. (2011) 'Valor nutritivo, fermentación in vitro y metabolitos secundarios de malezas y paja de maíz utilizadas para la alimentación del ganado lechero', *Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), pp. 120-130.

Mendoza Martínez, G.D., Velasco, R.R., 2016. *Alimentación de ganado bovino*, Tercera edición., Universidad autónoma metropolitana, México.

Nieto, D., Berisso, R., Demarchi, O., Scala, E. (2012) *Manual de Buenas Prácticas en Buenos Aires*. Argentina: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Ocampo, A., Cardozo, A., Tarazona, A., Ceballos, M.C., Murgueitio, E. (2011) 'La investigación participativa en Bienestar y Comportamiento animal en el trópico de América: oportunidades para nuevo conocimiento aplicado', *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 24(1), pp. 332–346.

Ogimoto, K., Imai, S., 1981 *Atlas de microbiología del rumen* Primera edición., Japan Scientific Societies Press., Japón.

ONU, 2019. Los gases de efecto invernadero le están robando el oxígeno a nuestros océanos. Disponible en:

<http://www.unenvironment.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/los-gases-de-efecto-invernadero-le-estan-robando-el-oxigeno>. Consultado: 2/2/21.

Orskov, E.R., 1982. *Protein Nutrition in Ruminants* Primera edición., Academic Press.

Ortiz-González, A.R., Morales-Luna, K.A., Vásquez-Torres, W., Gutiérrez-Espinosa, M.C. (2014) 'Digestibilidad aparente de *Tithonia diversifolia*, *Gliricidia sepium* y *Cratylia argentea* en juveniles de *Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818', *Revista Scielo*, 18(1), pp. 214–219.

Pasinato, A., Grigioni, G., Alende, M. (2018) *Producción bovinos para carne (2013-2017) Programa Nacional de Producción Animal*. Disponible en:

<https://inta.gob.ar/documentos/produccion-bovinos-para-carne-2013-2017-programa-nacional-de-produccion-animal>. Consultado: 12/2/20.

Pilay-Malavé, Michelle Vanessa. (2019) *Calidad nutricional de la moringa (Moringa oleifera lam) en las condiciones ambientales de la parroquia Manglaralto*. Ingeniería Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Poma-Chávez, C.-L. (2018) *Mitigación de las emisiones de metano del ganado vacuno por desfaunización ruminal en la E.E.A el Mantaro - Junín*. Ingeniería. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Centro del Perú- Huancayo.

Posada, S.L., Solano, R.N., Vergara, D.M.B. (2006) 'Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica in vitro de producción de gases en Medellín Colombia', *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*. 19, 407–414.

Ramírez, F. (2016) *Efecto de la fertilización orgánica y mineral en el cultivo de la Moringa (Moringa oleifera Lam)*. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Ramírez-Malavé, C.J. (2019) *Degradabilidad ruminal en caprinos criollos alimentados con dietas integrales cuya base forrajera es la moringa; Moringa oleífera Lam.* Ingeniería Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Reyes-Aguilera, E.A. (2017) 'Generación de biogás mediante el proceso de digestión anaerobia, a partir del aprovechamiento de sustratos orgánicos', *Revista Científica FAREM-Estelí*, (24), pp. 60–81. <https://doi.org/10.5377/farem.v0i24.5552>.

Rodríguez, M. (2010) *Morera un nuevo forraje para la alimentación del ganado.* Disponible en:

<https://biblioteca.ihatuey.cu/link/nuestraspublicaciones/morera.pdf>. Consultado: 12/3/20.

Rodríguez, R., Sosa, A., Rodríguez, Y. (2007) 'La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes', *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(4), pp. 303–311.

Rojas-López, T.A., Valencia-Trujillo, F.L. (2019) *Mecanismos de nutrición animal para reducir el efecto invernadero.* Universidad Nacional Abierta y a Distancia-ECAPMA.

Roman-Ponce, S., Hernandez-Medrano, J. (2016) *Producción y Medición de Metano (CH<sub>4</sub>) en ganado bovino.* México: Centro Nacional de Investigación disciplinaria en fisiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21578.57281>

Romero Huelva, M. (2012) *Uso de bloques multinutrientes de destrios de tomate y pepino como alternativa al concentrado en la dieta de caprino. Efectos sobre la fermentación y microbiota ruminal, la utilización de nutrientes y la producción y composición de la leche.* Disponible en:

<https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/7673>. Consultado: 12/12/20.

Rotger, A. (2004) *Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo.* Doctoral. Universidad autónoma de Barcelona.

Rua-Franco, M. (2017) *Calidad vs. el consumo de pastos.* Disponible en: <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/calidad-vs-el-consumo-de-pastos>. Consultado: 2/2/21.

Saavedra-Montañez, G.F. (2018) 'Evaluación del uso de morera (*Morus alba*) y tilo (*Sambucus nigra*) sobre algunos parámetros productivos en ganado lechero', *Revista veterinaria y zootecnia*, 12(1), pp. 14–26.

Sosa, A., Juana Galindo, Bocourt. (2007) 'Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control', *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(2), pp. 105.114.

Stritzler, N.-P., Rabotnikof, C.M., 2019. *Nutrición y alimentación de rumiantes* Primera edición., EdUNLPam, Argentina-Santa Rosa.

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. (1994) 'Un método simple de producción de gas que utiliza un transductor de presión para determinar la cinética de fermentación de los alimentos para rumiantes', *Ciencia y tecnología de la alimentación animal*, 48(4), pp. 185–197.

Torres, Cabrera, I., Pérez Morales. (2020) 'Efectos de las saponinas sobre la fermentación ruminal in vivo y el rendimiento de los animales', *Archivos Latino Americanos de nutrición*, 70(2), pp. 493–505.

Ungerfeld, E.M., Escobar-Bahamondes, P., Muñoz, C. (2018) 'Predicción y mitigación de las emisiones de metano de los rumiantes', *Revista Agro Productividad*, 11(2). Disponible en:  
<https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/115>

Vélez-Terranova, M., Gaona, R.C., Sánchez-Guerrero, H. (2014) 'Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal en Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán' México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), pp. 489–499.

Veloz-Vargas, C.-X., Barros-Rodríguez, M.-A., (2020) *Impacto ambiental de la inclusión de saponinas en dietas fibrosas sobre la función ruminal y mitigación de emisiones de dióxido de carbono y metano entérico en bovinos*. Ingeniería. Ciencias Agropecuaria, Universidad técnica de Ambato, Ambato-Ecuador.

Villeras, D., Montenegro, M. (2018) *El impacto de la ganadería en el medio ambiente y la seguridad humana global*. Disponible en:  
<https://derechoanimal.info/es/icalp/actividades/2018/el-impacto-de-la-ganaderia-en-el-medio-ambiente-y-la-seguridad-humana-global>. Consultado: 12/2/20.

Watts, G. (2019) *Las sorprendentes maneras para reducir los gases contaminantes que producen las vacas*. Disponible en:  
<https://www.bbc.com/mundo/vert-fut-49557404>. Consultado: 13/12/20.

Zhou, Y.Y., Mao, H.L., Jiang, F., Wang, J.K., Liu, J.X., McSweeney, C.S. (2011) 'Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep'. *Ciencia y tecnología de la alimentación animal*, 166–167(1), pp. 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.007>.

Zúñiga González, N. (2016) *Estimación de las emisiones en bovinos en los sistemas de producción lechera en pequeña escala a través del factor de conversión de metano*. Doctor. Facultad Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Autónoma del Estado de México.

**ANEXOS**

**Tabla 1A.** Datos generales, producción de metano entérico *in vitro* *Moringa oleifera*

| Tratamientos |   | Contenido-frasco g | Horas | Código | Presión Pascales | Volumen, ml gas |
|--------------|---|--------------------|-------|--------|------------------|-----------------|
| M0           | 1 | 0.505              | 3     | M0.1   | 2.98             | 19.70           |
| M0           | 1 | 0.505              | 6     | M0.1   | 1.73             | 10.90           |
| M0           | 1 | 0.505              | 9     | M0.1   | 2.13             | 12.90           |
| M0           | 1 | 0.505              | 12    | M0.1   | 1.78             | 11.12           |
| M0           | 1 | 0.505              | 24    | M0.1   | 3.31             | 22.00           |
| M0           | 1 | 0.505              | 48    | M0.1   | 2.71             | 17.1            |
| M0           | 1 | 0.505              | 72    | M0.1   | 2.47             | 15.6            |
| M0           | 1 | 0.505              | 96    | M0.1   | 1.64             | 10.5            |
| M0           | 1 | 0.502              | 3     | M0.2   | 3.85             | 22.50           |
| M0           | 1 | 0.502              | 6     | M0.2   | 2.47             | 15.60           |
| M0           | 1 | 0.502              | 9     | M0.2   | 2.52             | 16.10           |
| M0           | 1 | 0.502              | 12    | M0.2   | 2.29             | 14.80           |
| M0           | 1 | 0.502              | 24    | M0.2   | 4.49             | 28.00           |
| M0           | 1 | 0.502              | 48    | M0.2   | 4.75             | 30.1            |
| M0           | 1 | 0.502              | 72    | M0.2   | 0.94             | 7               |
| M0           | 1 | 0.502              | 96    | M0.2   | 1.5              | 8.9             |
| M0           | 1 | 0.509              | 3     | M0.3   | 4.25             | 27.20           |
| M0           | 1 | 0.509              | 6     | M0.3   | 2.51             | 15.50           |
| M0           | 1 | 0.509              | 9     | M0.3   | 2.47             | 14.90           |
| M0           | 1 | 0.509              | 12    | M0.3   | 2.28             | 13.90           |
| M0           | 1 | 0.509              | 24    | M0.3   | 4.36             | 27.60           |
| M0           | 1 | 0.509              | 48    | M0.3   | 3.05             | 20.9            |
| M0           | 1 | 0.509              | 72    | M0.3   | 2.25             | 14.6            |
| M0           | 1 | 0.509              | 96    | M0.3   | 0.67             | 4               |
| M0           | 1 | 0.511              | 3     | M0.4   | 4.39             | 27.60           |
| M0           | 1 | 0.511              | 6     | M0.4   | 2.78             | 16.90           |
| M0           | 1 | 0.511              | 9     | M0.4   | 2.89             | 17.00           |
| M0           | 1 | 0.511              | 12    | M0.4   | 2.40             | 15.60           |
| M0           | 1 | 0.511              | 24    | M0.4   | 4.69             | 28.50           |
| M0           | 1 | 0.511              | 48    | M0.4   | 3.56             | 21.8            |
| M0           | 1 | 0.511              | 72    | M0.4   | 3.13             | 22              |
| M0           | 1 | 0.511              | 96    | M0.4   | 2.1              | 12.5            |
| M0           | 1 | 0.503              | 3     | M0.5   | 4.66             | 28.60           |
| M0           | 1 | 0.503              | 6     | M0.5   | 4.15             | 26.00           |
| M0           | 1 | 0.503              | 9     | M0.5   | 3.10             | 20.60           |
| M0           | 1 | 0.503              | 12    | M0.5   | 2.76             | 19.00           |

|                                      |   |        |    |       |       |        |
|--------------------------------------|---|--------|----|-------|-------|--------|
| M0                                   | 1 | 0. 503 | 24 | M0.5  | 5. 21 | 33. 00 |
| M0                                   | 1 | 0. 503 | 48 | M0.5  | 5. 4  | 35     |
| M0                                   | 1 | 0. 503 | 72 | M0.5  | 3. 5  | 23     |
| M0                                   | 1 | 0. 503 | 96 | M0.5  | 1. 91 | 14. 6  |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 3  | M0.6  | 4. 15 | 26. 80 |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 6  | M0.6  | 2. 55 | 16. 00 |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 9  | M0.6  | 1. 13 | 7. 20  |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 12 | M0.6  | 1. 54 | 10. 00 |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 24 | M0.6  | 4. 65 | 29. 80 |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 48 | M0.6  | 3. 8  | 23. 2  |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 72 | M0.6  | 3. 01 | 20. 8  |
| M0                                   | 1 | 0. 506 | 96 | M0.6  | 2. 35 | 14. 8  |
| <i>Moringa oleifera</i> 2 % saponina |   |        |    |       |       |        |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 3  | M2.7  | 3. 71 | 20. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 6  | M2.7  | 2. 97 | 18. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 9  | M2.7  | 2. 58 | 15. 16 |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 12 | M2.7  | 2. 28 | 14. 30 |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 24 | M2.7  | 4. 60 | 29. 50 |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 48 | M2.7  | 4. 85 | 30. 5  |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 72 | M2.7  | 2. 9  | 19     |
| M2                                   | 2 | 0. 503 | 96 | M2.7  | 1. 78 | 11     |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 3  | M2.8  | 5. 34 | 33. 30 |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 6  | M2.8  | 3. 79 | 24. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 9  | M2.8  | 3. 07 | 20. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 12 | M2.8  | 2. 06 | 12. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 24 | M2.8  | 4. 09 | 26. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 48 | M2.8  | 4. 9  | 31. 2  |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 72 | M2.8  | 3. 95 | 26. 1  |
| M2                                   | 2 | 0. 51  | 96 | M2.8  | 2. 41 | 15. 9  |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 3  | M2.9  | 4. 92 | 30. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 6  | M2.9  | 3. 39 | 22. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 9  | M2.9  | 2. 40 | 18. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 12 | M2.9  | 2. 07 | 15. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 24 | M2.9  | 4. 21 | 26. 60 |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 48 | M2.9  | 1. 43 | 12     |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 72 | M2.9  | 2. 81 | 20     |
| M2                                   | 2 | 0. 506 | 96 | M2.9  | 2. 06 | 15     |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 3  | M2.10 | 5. 21 | 29. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 6  | M2.10 | 3. 48 | 22. 00 |

|                                      |   |        |    |       |       |        |
|--------------------------------------|---|--------|----|-------|-------|--------|
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 9  | M2.10 | 1. 60 | 10. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 12 | M2.10 | 1. 44 | 9. 80  |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 24 | M2.10 | 0. 87 | 7. 00  |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 48 | M2.10 | 1. 15 | 9      |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 72 | M2.10 | 0. 86 | 6. 3   |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 96 | M2.10 | 0. 87 | 6. 5   |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 3  | M2.11 | 5. 11 | 33. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 6  | M2.11 | 3. 55 | 20. 20 |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 9  | M2.11 | 2. 68 | 9. 00  |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 12 | M2.11 | 2. 29 | 10. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 24 | M2.11 | 4. 95 | 31. 80 |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 48 | M2.11 | 5. 25 | 34. 8  |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 72 | M2.11 | 3. 87 | 22. 8  |
| M2                                   | 2 | 0. 507 | 96 | M2.11 | 2. 44 | 11     |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 3  | M2.12 | 4. 49 | 30. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 6  | M2.12 | 3. 02 | 20. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 9  | M2.12 | 2. 80 | 16. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 12 | M2.12 | 2. 25 | 14. 00 |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 24 | M2.12 | 4. 61 | 31. 70 |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 48 | M2.12 | 5. 5  | 39     |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 72 | M2.12 | 3. 6  | 23. 9  |
| M2                                   | 2 | 0. 511 | 96 | M2.12 | 2. 16 | 13     |
| <i>Moringa oleifera 4 % saponina</i> |   |        |    |       |       |        |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 3  | M4.13 | 4. 66 | 31. 00 |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 6  | M4.13 | 2. 58 | 17. 00 |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 9  | M4.13 | 2. 60 | 16. 50 |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 12 | M4.13 | 2. 23 | 14. 50 |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 24 | M4.13 | 3. 57 | 23. 00 |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 48 | M4.13 | 3. 07 | 20. 5  |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 72 | M4.13 | 2. 75 | 18     |
| M4                                   | 3 | 0. 512 | 96 | M4.13 | 1. 94 | 11. 5  |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 3  | M4.14 | 6. 16 | 42. 00 |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 6  | M4.14 | 3. 43 | 23. 00 |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 9  | M4.14 | 2. 93 | 19. 50 |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 12 | M4.14 | 2. 39 | 16. 00 |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 24 | M4.14 | 4. 63 | 31. 20 |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 48 | M4.14 | 2. 78 | 19. 6  |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 72 | M4.14 | 3. 77 | 24. 8  |
| M4                                   | 3 | 0. 503 | 96 | M4.14 | 0. 61 | 5      |

|    |   |       |    |       |      |       |
|----|---|-------|----|-------|------|-------|
| M4 | 3 | 0.509 | 3  | M4.15 | 5.98 | 40.00 |
| M4 | 3 | 0.509 | 6  | M4.15 | 3.35 | 22.00 |
| M4 | 3 | 0.509 | 9  | M4.15 | 3.10 | 20.00 |
| M4 | 3 | 0.509 | 12 | M4.15 | 2.29 | 15.00 |
| M4 | 3 | 0.509 | 24 | M4.15 | 4.76 | 31.30 |
| M4 | 3 | 0.509 | 48 | M4.15 | 5.5  | 37.8  |
| M4 | 3 | 0.509 | 72 | M4.15 | 3.95 | 27    |
| M4 | 3 | 0.509 | 96 | M4.15 | 2.48 | 13.8  |
| M4 | 3 | 0.512 | 3  | M4.16 | 5.98 | 40.00 |
| M4 | 3 | 0.512 | 6  | M4.16 | 3.36 | 22.50 |
| M4 | 3 | 0.512 | 9  | M4.16 | 3.07 | 20.00 |
| M4 | 3 | 0.512 | 12 | M4.16 | 2.23 | 15.00 |
| M4 | 3 | 0.512 | 24 | M4.16 | 1.32 | 8.80  |
| M4 | 3 | 0.512 | 48 | M4.16 | 1.7  | 11    |
| M4 | 3 | 0.512 | 72 | M4.16 | 1.39 | 9     |
| M4 | 3 | 0.512 | 96 | M4.16 | 1.04 | 7.2   |
| M4 | 3 | 0.511 | 3  | M4.17 | 5.90 | 38.00 |
| M4 | 3 | 0.511 | 6  | M4.17 | 3.36 | 21.30 |
| M4 | 3 | 0.511 | 9  | M4.17 | 2.93 | 18.50 |
| M4 | 3 | 0.511 | 12 | M4.17 | 2.41 | 13.60 |
| M4 | 3 | 0.511 | 24 | M4.17 | 2.50 | 14.80 |
| M4 | 3 | 0.511 | 48 | M4.17 | 2.80 | 16.7  |
| M4 | 3 | 0.511 | 72 | M4.17 | 2.74 | 16    |
| M4 | 3 | 0.511 | 96 | M4.17 | 1.04 | 7     |
| M4 | 3 | 0.507 | 3  | M4.18 | 5.43 | 43.40 |
| M4 | 3 | 0.507 | 6  | M4.18 | 3.03 | 21.50 |
| M4 | 3 | 0.507 | 9  | M4.18 | 2.76 | 19.40 |
| M4 | 3 | 0.507 | 12 | M4.18 | 2.31 | 16.00 |
| M4 | 3 | 0.507 | 24 | M4.18 | 3.17 | 23.30 |
| M4 | 3 | 0.507 | 48 | M4.18 | 1.83 | 11.5  |
| M4 | 3 | 0.507 | 72 | M4.18 | 1.31 | 7     |
| M4 | 3 | 0.507 | 96 | M4.18 | 1.12 | 4.8   |

**Tabla 2A.** Datos generales. producción de metano entérico de *Gliricidia sepium*

| Tratamientos |   | Contenido-frasco g | Horas | Código | Presión Pascales | Volumen. ml gas |
|--------------|---|--------------------|-------|--------|------------------|-----------------|
| GS0          | 4 | 0.511              | 3     | GS0.19 | 3.56             | 24.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 6     | GS0.19 | 1.88             | 12.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 9     | GS0.19 | 2.05             | 13.60           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 12    | GS0.19 | 1.65             | 11.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 24    | GS0.19 | 3.81             | 26.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 48    | GS0.19 | 5.08             | 34              |
| GS0          | 4 | 0.511              | 72    | GS0.19 | 3.36             | 21.8            |
| GS0          | 4 | 0.511              | 96    | GS0.19 | 2.05             | 12.5            |
| GS0          | 4 | 0.505              | 3     | GS0.20 | 4.72             | 31.20           |
| GS0          | 4 | 0.505              | 6     | GS0.20 | 2.32             | 15.00           |
| GS0          | 4 | 0.505              | 9     | GS0.20 | 2.33             | 15.10           |
| GS0          | 4 | 0.505              | 12    | GS0.20 | 1.97             | 13.00           |
| GS0          | 4 | 0.505              | 24    | GS0.20 | 4.10             | 27.00           |
| GS0          | 4 | 0.505              | 48    | GS0.20 | 4.62             | 31              |
| GS0          | 4 | 0.505              | 72    | GS0.20 | 2.34             | 15              |
| GS0          | 4 | 0.505              | 96    | GS0.20 | 1.73             | 11              |
| GS0          | 4 | 0.511              | 3     | GS0.21 | 4.74             | 32.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 6     | GS0.22 | 2.14             | 14.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 9     | GS0.23 | 1.40             | 9.50            |
| GS0          | 4 | 0.511              | 12    | GS0.24 | 1.60             | 10.60           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 24    | GS0.25 | 3.39             | 21.90           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 48    | GS0.26 | 1.07             | 7               |
| GS0          | 4 | 0.511              | 72    | GS0.27 | 0.78             | 2.9             |
| GS0          | 4 | 0.511              | 96    | GS0.28 | 1.02             | 7.6             |
| GS0          | 4 | 0.510              | 3     | GS0.22 | 4.90             | 33.00           |
| GS0          | 4 | 0.510              | 6     | GS0.23 | 2.39             | 16.00           |
| GS0          | 4 | 0.510              | 9     | GS0.24 | 2.67             | 18.00           |
| GS0          | 4 | 0.510              | 12    | GS0.25 | 2.28             | 15.00           |
| GS0          | 4 | 0.510              | 24    | GS0.26 | 4.20             | 28.80           |
| GS0          | 4 | 0.510              | 48    | GS0.27 | 4.27             | 31.5            |
| GS0          | 4 | 0.510              | 72    | GS0.28 | 1.47             | 9.8             |
| GS0          | 4 | 0.510              | 96    | GS0.29 | 1.46             | 10              |
| GS0          | 4 | 0.511              | 3     | GS0.23 | 3.42             | 22.30           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 6     | GS0.24 | 2.18             | 14.00           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 9     | GS0.25 | 2.36             | 15.50           |
| GS0          | 4 | 0.511              | 12    | GS0.26 | 1.95             | 12.80           |

|                                  |   |       |    |        |      |       |
|----------------------------------|---|-------|----|--------|------|-------|
| GS0                              | 4 | 0.511 | 24 | GS0.27 | 4.18 | 27.00 |
| GS0                              | 4 | 0.511 | 48 | GS0.28 | 5.51 | 35.2  |
| GS0                              | 4 | 0.511 | 72 | GS0.29 | 4.21 | 28.5  |
| GS0                              | 4 | 0.511 | 96 | GS0.30 | 2.73 | 19.1  |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 3  | GS0.24 | 4.53 | 30.00 |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 6  | GS0.24 | 2.20 | 14.00 |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 9  | GS0.24 | 2.64 | 17.50 |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 12 | GS0.24 | 2.14 | 15.00 |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 24 | GS0.24 | 4.74 | 30.80 |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 48 | GS0.24 | 2.05 | 12    |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 72 | GS0.24 | 2.72 | 17.5  |
| GS0                              | 4 | 0.503 | 96 | GS0.24 | 1.79 | 11    |
| Gliricidia sepium 2% de saponina |   |       |    |        |      |       |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 3  | GS2.25 | 4.50 | 30.00 |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 6  | GS2.25 | 2.02 | 13.10 |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 9  | GS2.25 | 1.89 | 12.50 |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 12 | GS2.25 | 1.54 | 10.30 |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 24 | GS2.25 | 4.05 | 27.50 |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 48 | GS2.25 | 4.87 | 32    |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 72 | GS2.25 | 2.20 | 17.9  |
| GS2                              | 5 | 0.511 | 96 | GS2.25 | 1.57 | 10.5  |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 3  | GS2.26 | 5.66 | 38.90 |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 6  | GS2.26 | 1.89 | 12.10 |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 9  | GS2.26 | 2.02 | 12.30 |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 12 | GS2.26 | 1.76 | 12.00 |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 24 | GS2.26 | 4.08 | 29.00 |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 48 | GS2.26 | 4.95 | 32.0  |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 72 | GS2.26 | 4.04 | 26.9  |
| GS2                              | 5 | 0.505 | 96 | GS2.26 | 2.89 | 19.0  |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 3  | GS2.27 | 5.02 | 33.00 |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 6  | GS2.27 | 1.85 | 12.00 |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 9  | GS2.27 | 2.10 | 14.00 |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 12 | GS2.27 | 2.04 | 13.40 |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 24 | GS2.27 | 3.79 | 25.80 |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 48 | GS2.27 | 4.12 | 26.7  |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 72 | GS2.27 | 0.82 | 8     |
| GS2                              | 5 | 0.508 | 96 | GS2.27 | 1.6  | 10.8  |
| GS2                              | 5 | 0.501 | 3  | GS2.28 | 5.77 | 38.00 |
| GS2                              | 5 | 0.501 | 6  | GS2.28 | 2.73 | 18.00 |

|                                      |   |       |    |        |      |       |
|--------------------------------------|---|-------|----|--------|------|-------|
| GS2                                  | 5 | 0.501 | 9  | GS2.28 | 2.73 | 18.50 |
| GS2                                  | 5 | 0.501 | 12 | GS2.28 | 2.11 | 14.00 |
| GS2                                  | 5 | 0.501 | 24 | GS2.28 | 4.74 | 31.20 |
| GS2                                  | 5 | 0.501 | 48 | GS2.28 | 1.91 | 11.8  |
| GS2                                  | 5 | 0.501 | 72 | GS2.28 | 1.98 | 12.5  |
| GS2                                  | 5 | 0.501 | 96 | GS2.28 | 1.62 | 10.2  |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 3  | GS2.29 | 5.85 | 38.20 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 6  | GS2.29 | 2.78 | 18.70 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 9  | GS2.29 | 2.81 | 19.00 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 12 | GS2.29 | 2.12 | 14.00 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 24 | GS2.29 | 5.15 | 34.80 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 48 | GS2.29 | 5.72 | 37.8  |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 72 | GS2.29 | 4.16 | 29    |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 96 | GS2.29 | 2.55 | 18.8  |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 3  | GS2.30 | 5.42 | 35.20 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 6  | GS2.30 | 2.52 | 19.00 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 9  | GS2.30 | 2.96 | 22.00 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 12 | GS2.30 | 2.05 | 15.90 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 24 | GS2.30 | 2.36 | 18.00 |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 48 | GS2.30 | 2.77 | 20.5  |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 72 | GS2.30 | 2.16 | 15.4  |
| GS2                                  | 5 | 0.505 | 96 | GS2.30 | 2.01 | 15.3  |
| <i>Gliricidia sepium</i> 4% saponina |   |       |    |        |      |       |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 3  | GS4.31 | 2.98 | 19.60 |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 6  | GS4.31 | 1.73 | 10.90 |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 9  | GS4.31 | 2.13 | 13.00 |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 12 | GS4.31 | 1.78 | 11.12 |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 24 | GS4.31 | 3.31 | 22.00 |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 48 | GS4.31 | 2.71 | 16.8  |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 72 | GS4.31 | 2.47 | 15.9  |
| GS4                                  | 6 | 0.509 | 96 | GS4.31 | 1.64 | 10.2  |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 3  | GS4.32 | 3.85 | 22.50 |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 6  | GS4.32 | 2.47 | 15.60 |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 9  | GS4.32 | 2.52 | 16.10 |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 12 | GS4.32 | 2.29 | 14.80 |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 24 | GS4.32 | 4.49 | 28.00 |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 48 | GS4.32 | 4.75 | 30.1  |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 72 | GS4.32 | 0.94 | 7     |
| GS4                                  | 6 | 0.506 | 96 | GS4.32 | 1.5  | 8.9   |

|     |   |       |    |        |      |       |
|-----|---|-------|----|--------|------|-------|
| GS4 | 6 | 0.510 | 3  | GS4.33 | 4.25 | 27.20 |
| GS4 | 6 | 0.510 | 6  | GS4.33 | 2.51 | 15.50 |
| GS4 | 6 | 0.510 | 9  | GS4.33 | 2.47 | 14.90 |
| GS4 | 6 | 0.510 | 12 | GS4.33 | 2.28 | 13.90 |
| GS4 | 6 | 0.510 | 24 | GS4.33 | 4.36 | 27.60 |
| GS4 | 6 | 0.510 | 48 | GS4.33 | 3.05 | 20.9  |
| GS4 | 6 | 0.510 | 72 | GS4.33 | 2.25 | 14.6  |
| GS4 | 6 | 0.510 | 96 | GS4.33 | 0.67 | 4     |
| GS4 | 6 | 0.505 | 3  | GS4.34 | 4.39 | 27.60 |
| GS4 | 6 | 0.505 | 6  | GS4.34 | 2.78 | 16.90 |
| GS4 | 6 | 0.505 | 9  | GS4.34 | 2.89 | 17.80 |
| GS4 | 6 | 0.505 | 12 | GS4.34 | 2.40 | 15.60 |
| GS4 | 6 | 0.505 | 24 | GS4.34 | 4.69 | 28.80 |
| GS4 | 6 | 0.505 | 48 | GS4.34 | 3.56 | 21.8  |
| GS4 | 6 | 0.505 | 72 | GS4.34 | 3.13 | 20.3  |
| GS4 | 6 | 0.505 | 96 | GS4.34 | 2.1  | 13    |
| GS4 | 6 | 0.509 | 3  | GS4.35 | 6.39 | 42.80 |
| GS4 | 6 | 0.509 | 6  | GS4.35 | 2.88 | 19.90 |
| GS4 | 6 | 0.509 | 9  | GS4.35 | 3.00 | 20.50 |
| GS4 | 6 | 0.509 | 12 | GS4.35 | 1.94 | 13.00 |
| GS4 | 6 | 0.509 | 24 | GS4.35 | 4.66 | 31.00 |
| GS4 | 6 | 0.509 | 48 | GS4.35 | 4.32 | 29    |
| GS4 | 6 | 0.509 | 72 | GS4.35 | 3.78 | 26.8  |
| GS4 | 6 | 0.509 | 96 | GS4.35 | 2.27 | 14    |
| GS4 | 6 | 0.508 | 3  | GS4.36 | 6.16 | 41.30 |
| GS4 | 6 | 0.508 | 6  | GS4.36 | 2.68 | 18.00 |
| GS4 | 6 | 0.508 | 9  | GS4.36 | 2.54 | 18.50 |
| GS4 | 6 | 0.508 | 12 | GS4.36 | 1.81 | 11.90 |
| GS4 | 6 | 0.508 | 24 | GS4.36 | 3.13 | 21.20 |
| GS4 | 6 | 0.508 | 48 | GS4.36 | 2.47 | 18.5  |
| GS4 | 6 | 0.508 | 72 | GS4.36 | 1.64 | 11    |
| GS4 | 6 | 0.508 | 96 | GS4.36 | 1.51 | 9     |

**Tabla 3A.** Datos generales. producción de metano entérico de *Morus alba*

| Tratamiento |   | Contenido-<br>frasco g | Horas | Código  | Presión Pascales | Volumen. ml<br>gas |
|-------------|---|------------------------|-------|---------|------------------|--------------------|
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 3     | Mr0.37  | 3. 45            | 21. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 6     | Mr0.37  | 1. 65            | 10. 10             |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 9     | Mr0.37  | 2. 09            | 13. 20             |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 12    | Mr0.37  | 1. 29            | 8. 70              |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 24    | Mr0.37  | 2. 01            | 12. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 48    | Mr0.37  | 2. 04            | 12. 5              |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 72    | Mr0. 37 | 2. 07            | 12. 6              |
| Mr0         | 7 | 0. 507                 | 96    | Mr0.37  | 1. 75            | 11                 |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 3     | Mr0.38  | 5. 90            | 33. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 6     | Mr0.38  | 2. 81            | 16. 10             |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 9     | Mr0.38  | 1. 49            | 10. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 12    | Mr0.38  | 2. 18            | 12. 30             |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 24    | Mr0.38  | 2. 21            | 12. 20             |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 48    | Mr0.38  | 5. 24            | 30                 |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 72    | Mr0.38  | 4. 51            | 25. 5              |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 96    | Mr0.38  | 2. 9             | 16                 |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 3     | Mr.39   | 5. 31            | 36. 20             |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 6     | Mr.39   | 2. 31            | 15. 70             |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 9     | Mr.39   | 2. 26            | 15. 50             |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 12    | Mr.39   | 1. 80            | 11. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 24    | Mr.39   | 2. 15            | 13. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 48    | Mr.39   | 2. 14            | 14. 8              |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 72    | Mr.39   | 2. 65            | 19                 |
| Mr0         | 7 | 0. 505                 | 96    | Mr.39   | 1. 7             | 11                 |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 3     | Mr.40   | 5. 92            | 38. 90             |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 6     | Mr.40   | 2. 42            | 15. 50             |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 9     | Mr.40   | 2. 97            | 19. 50             |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 12    | Mr.40   | 2. 15            | 13. 60             |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 24    | Mr.40   | 4. 70            | 31. 00             |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 48    | Mr.40   | 2. 76            | 19                 |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 72    | Mr.40   | 0. 45            | 4                  |
| Mr0         | 7 | 0. 514                 | 96    | Mr.40   | 1. 49            | 9. 5               |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 3     | Mr.41   | 5. 56            | 36. 30             |
| Mr0         | 7 | 0. 506                 | 6     | Mr.41   | 2. 35            | 15. 20             |

|                        |   |       |    |        |      |       |
|------------------------|---|-------|----|--------|------|-------|
| Mr0                    | 7 | 0.506 | 9  | Mr.41  | 2.90 | 18.60 |
| Mr0                    | 7 | 0.506 | 12 | Mr.41  | 2.16 | 12.00 |
| Mr0                    | 7 | 0.506 | 24 | Mr.41  | 2.14 | 12.20 |
| Mr0                    | 7 | 0.506 | 48 | Mr.41  | 4.47 | 30.5  |
| Mr0                    | 7 | 0.506 | 72 | Mr.41  | 0.74 | 3.8   |
| Mr0                    | 7 | 0.506 | 96 | Mr.41  | 0.58 | 3     |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 3  | Mr.42  | 4.82 | 31.10 |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 6  | Mr.42  | 1.92 | 12.00 |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 9  | Mr.42  | 2.34 | 15.50 |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 12 | Mr.42  | 1.30 | 8.50  |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 24 | Mr.42  | 1.87 | 11.50 |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 48 | Mr.42  | 2.31 | 16    |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 72 | Mr.42  | 1.95 | 12.5  |
| Mr0                    | 7 | 0.507 | 96 | Mr.42  | 0.46 | 4     |
| Morus alba 2% saponina |   |       |    |        |      |       |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 3  | Mr2.43 | 3.89 | 24.90 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 6  | Mr2.43 | 1.62 | 10.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 9  | Mr2.43 | 2.18 | 13.40 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 12 | Mr2.43 | 1.65 | 10.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 24 | Mr2.43 | 3.75 | 25.10 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 48 | Mr2.43 | 5.05 | 32.5  |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 72 | Mr2.43 | 1.12 | 7.4   |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 96 | Mr2.43 | 1.81 | 11    |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 3  | Mr2.44 | 6.51 | 43.80 |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 6  | Mr2.44 | 2.52 | 16.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 9  | Mr2.44 | 1.81 | 12.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 12 | Mr2.44 | 2.24 | 15.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 24 | Mr2.44 | 2.24 | 15.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 48 | Mr2.44 | 0.17 | 1     |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 72 | Mr2.44 | 1.28 | 7.8   |
| Mr2                    | 8 | 0.509 | 96 | Mr2.44 | 1.23 | 7     |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 3  | Mr2.45 | 5.27 | 35.40 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 6  | Mr2.45 | 2.06 | 13.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 9  | Mr2.45 | 2.03 | 13.50 |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 12 | Mr2.45 | 1.09 | 6.00  |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 24 | Mr2.45 | 1.21 | 8.00  |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 48 | Mr2.45 | 2.81 | 19    |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 72 | Mr2.45 | 2.23 | 13    |
| Mr2                    | 8 | 0.506 | 96 | Mr2.45 | 0.79 | 6     |

|                        |   |       |    |        |      |       |
|------------------------|---|-------|----|--------|------|-------|
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 3  | Mr2.46 | 2.42 | 18.20 |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 6  | Mr2.46 | 0.27 | 2.00  |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 9  | Mr2.46 | 0.23 | 0.22  |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 12 | Mr2.46 | 0.57 | 5.00  |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 24 | Mr2.46 | 0.82 | 7.30  |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 48 | Mr2.46 | 1.3  | 10.5  |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 72 | Mr2.46 | 4.21 | 33    |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 96 | Mr2.46 | 1.74 | 12    |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 3  | Mr2.47 | 6.19 | 42.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 6  | Mr2.47 | 2.45 | 16.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 9  | Mr2.47 | 2.67 | 18.20 |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 12 | Mr2.47 | 1.59 | 10.10 |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 24 | Mr2.47 | 4.71 | 31.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 48 | Mr2.47 | 5.52 | 37.4  |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 72 | Mr2.47 | 3.95 | 28.5  |
| Mr2                    | 8 | 0.502 | 96 | Mr2.47 | 2.57 | 16.5  |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 3  | Mr2.48 | 5.88 | 40.20 |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 6  | Mr2.48 | 2.63 | 17.80 |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 9  | Mr2.48 | 2.98 | 21.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 12 | Mr2.48 | 1.94 | 13.00 |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 24 | Mr2.48 | 5.08 | 33.40 |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 48 | Mr2.48 | 5.64 | 40    |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 72 | Mr2.48 | 4.34 | 28    |
| Mr2                    | 8 | 0.504 | 96 | Mr2.48 | 2.74 | 19    |
| Morus alba 4% saponina |   |       |    |        |      |       |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 3  | Mr4.49 | 5.96 | 40.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 6  | Mr4.49 | 2.43 | 16.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 9  | Mr4.49 | 3.10 | 21.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 12 | Mr4.49 | 2.20 | 15.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 24 | Mr4.49 | 3.56 | 22.50 |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 48 | Mr4.49 | 5.61 | 37.8  |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 72 | Mr4.49 | 4.16 | 29    |
| Mr4                    | 9 | 0.504 | 96 | Mr4.49 | 1.28 | 7.5   |
| Mr4                    | 9 | 0.507 | 3  | Mr4.50 | 5.93 | 41.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.507 | 6  | Mr4.50 | 2.41 | 16.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.507 | 9  | Mr4.50 | 3.13 | 21.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.507 | 12 | Mr4.50 | 2.10 | 14.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.507 | 24 | Mr4.50 | 5.30 | 36.00 |
| Mr4                    | 9 | 0.507 | 48 | Mr4.50 | 5.24 | 38    |

|     |   |       |    |        |      |       |
|-----|---|-------|----|--------|------|-------|
| Mr4 | 9 | 0.507 | 72 | Mr4.50 | 4.02 | 27    |
| Mr4 | 9 | 0.507 | 96 | Mr4.50 | 2.71 | 19    |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 3  | Mr4.51 | 5.21 | 34.00 |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 6  | Mr4.51 | 2.02 | 13.00 |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 9  | Mr4.51 | 2.36 | 16.00 |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 12 | Mr4.51 | 1.68 | 10.90 |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 24 | Mr4.51 | 4.07 | 28.50 |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 48 | Mr4.51 | 5    | 33    |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 72 | Mr4.51 | 3.88 | 27    |
| Mr4 | 9 | 0.509 | 96 | Mr4.51 | 2.8  | 18    |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 3  | Mr4.52 | 4.02 | 25.60 |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 6  | Mr4.52 | 1.57 | 10.00 |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 9  | Mr4.52 | 2.13 | 13.60 |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 12 | Mr4.52 | 1.34 | 8.50  |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 24 | Mr4.52 | 3.58 | 22.80 |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 48 | Mr4.52 | 4.4  | 30    |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 72 | Mr4.52 | 3.29 | 21    |
| Mr4 | 9 | 0.508 | 96 | Mr4.52 | 2.07 | 12    |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 3  | Mr4.53 | 6.48 | 45.00 |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 6  | Mr4.53 | 2.71 | 17.00 |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 9  | Mr4.53 | 3.12 | 21.90 |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 12 | Mr4.53 | 1.98 | 13.00 |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 24 | Mr4.53 | 5.37 | 39.20 |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 48 | Mr4.53 | 5.45 | 37.8  |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 72 | Mr4.53 | 3.92 | 28.3  |
| Mr4 | 9 | 0.511 | 96 | Mr4.53 | 3.07 | 20.5  |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 3  | Mr4.54 | 6.29 | 43.20 |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 6  | Mr4.54 | 2.41 | 18.70 |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 9  | Mr4.54 | 2.97 | 20.30 |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 12 | Mr4.54 | 2.17 | 15.80 |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 24 | Mr4.54 | 5.56 | 38.00 |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 48 | Mr4.54 | 5.15 | 33.9  |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 72 | Mr4.54 | 3.73 | 25.8  |
| Mr4 | 9 | 0.504 | 96 | Mr4.54 | 2.46 | 18.8  |

**Tabla 4A.** PH de materia seca incubada *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium* y *Morus alba* en análisis de la población protozoaria

| <i>Moringa oleifera</i>              |       |
|--------------------------------------|-------|
| Código                               | PH    |
| 1                                    | 7. 18 |
| 2                                    | 7. 19 |
| 3                                    | 7. 22 |
| 4                                    | 7. 18 |
| 5                                    | 7. 15 |
| 6                                    | 7. 17 |
| <i>Moringa oleifera</i> 2% saponinas |       |
| 7                                    | 7. 17 |
| 8                                    | 7. 23 |
| 9                                    | 7. 21 |
| 10                                   | 7. 20 |
| 11                                   | 7. 12 |
| 12                                   | no    |
| <i>Moringa oleifera</i> 4% saponinas |       |
| 13                                   | 7. 35 |
| 14                                   | 7. 17 |
| 15                                   | 7. 22 |
| 16                                   | 7. 20 |
| 17                                   | 7. 15 |
| 18                                   | 7. 15 |
| <i>Gliricidia sepium</i>             |       |
| 19                                   | 7. 20 |
| 20                                   | 7. 25 |
| 21                                   | 7. 26 |
| 22                                   | 7. 25 |
| 23                                   | 7. 21 |
| 24                                   | 7. 18 |
| <i>Gliricidia sepium</i> 2% saponina |       |
| 25                                   | 7. 24 |
| 26                                   | 7. 25 |
| 27                                   | 7. 25 |
| 28                                   | 7. 21 |
| 29                                   | 7. 46 |
| 30                                   | 7. 42 |
| <i>Gliricidia sepium</i> 4% saponina |       |

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| 31                            | 7. 24 |
| 32                            | 7. 35 |
| 33                            | 7. 26 |
| 34                            | 7. 27 |
| 35                            | 7. 29 |
| 36                            | 7. 18 |
| <i>Morus alba</i>             |       |
| 37                            | 7. 36 |
| 38                            | 7. 32 |
| 39                            | 7. 23 |
| 40                            | 7. 54 |
| 41                            | 7. 42 |
| 42                            | 7. 40 |
| <i>Morus alba 2% saponina</i> |       |
| 43                            | 7. 20 |
| 44                            | 7. 35 |
| 45                            | 7. 19 |
| 46                            | 7. 17 |
| 47                            | 7. 23 |
| 48                            | 7. 33 |
| <i>Morus alba 4% saponina</i> |       |
| 49                            | 7. 36 |
| 50                            | 7. 31 |
| 51                            | 7. 29 |
| 52                            | 7. 37 |
| 53                            | 7. 18 |
| 54                            | 7. 22 |

**Tabla 5A.** Análisis de varianza de producción de gas metano, después de 3 horas de incubación de la materia seca por INFOSTAD

| Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| mlgas/Ms incubada | 48 | 0,67           | 0,60              | 13,22 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 1444,48 | 8  | 180,56 | 9,68 | <0,0001 |
| Tratamiento | 1444,48 | 8  | 180,56 | 9,68 | <0,0001 |
| Error       | 727,10  | 39 | 18,64  |      |         |
| Total       | 2171,58 | 47 |        |      |         |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,75178

| Caso | Tratamiento | Medias | Columna5 | Columna6 | Columna7 | Columna8 |
|------|-------------|--------|----------|----------|----------|----------|
| 1    | T6          | 24,08  | A        |          |          |          |
| 2    | T1          | 25,36  | A        |          |          |          |
| 3    | T4          | 28,38  | A        | B        |          |          |
| 4    | T2          | 29,68  | A        | B        | C        |          |
| 5    | T7          | 34,71  |          | B        | C        | D        |
| 6    | T5          | 36,39  |          | B        | C        | D        |
| 7    | T8          | 36,84  |          | B        | C        | D        |
| 8    | T3          | 38,29  |          |          | C        | D        |
| 9    | T9          | 40,39  |          |          |          | D        |

**Tabla 6A.** Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 9 horas de incubación por INFOSTAD.

| Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| mlgas/Ms incubada | 48 | 0,41           | 0,29              | 14,10 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 2392,37 | 8  | 299,05 | 3,42 | 0,0045  |
| Tratamiento | 2392,37 | 8  | 299,05 | 3,42 | 0,0045  |
| Error       | 3410,63 | 39 | 87,45  |      |         |
| Total       | 5803,00 | 47 |        |      |         |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=18,86245

| Caso | Tratamiento | Medias | Columna5 | Columna6 | Columna1 | Columna7 |
|------|-------------|--------|----------|----------|----------|----------|
| 1    | T1          | 57,30  | A        |          |          |          |
| 2    | T4          | 58,77  | A        | B        |          |          |
| 3    | T7          | 58,86  | A        | B        |          |          |
| 4    | T2          | 65,33  | A        | B        |          | C        |
| 5    | T6          | 66,35  | A        | B        |          | C        |
| 6    | T8          | 66,69  | A        | B        |          | C        |
| 7    | T5          | 69,39  | A        | B        |          | C        |
| 8    | T9          | 76,24  |          | B        |          | C        |
| 9    | T3          | 77,83  |          |          |          | C        |

**Tabla 7A.** Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 12 horas de incubación por INFOTAD.

| Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| mlgas/Ms incubada | 48 | 0,41           | 0,29              | 13,71 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 3150,91 | 8  | 393,86 | 3,40 | 0,0047  |
| Tratamiento | 3150,91 | 8  | 393,86 | 3,40 | 0,0047  |
| Error       | 4517,23 | 39 | 115,83 |      |         |
| Total       | 7668,14 | 47 |        |      |         |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=22,02476

| Caso | Tratamiento | Medias | Columna5 | Columna6 | Columna7 |
|------|-------------|--------|----------|----------|----------|
| 1    | T4          | 69,42  | A        |          |          |
| 2    | T1          | 71,10  | A        | B        |          |
| 3    | T7          | 74,19  | A        | B        | C        |
| 4    | T8          | 74,37  | A        | B        | C        |
| 5    | T6          | 75,60  | A        | B        | C        |
| 6    | T2          | 77,54  | A        | B        | C        |
| 7    | T5          | 80,13  | A        | B        | C        |
| 8    | T3          | 92,52  |          | B        | C        |
| 9    | T9          | 93,78  |          |          | C        |

**Tabla 8A.** Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 24 horas de incubación por INFOTAD.

| Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| mlgas/Ms incubada | 49 | 0,35           | 0,22              | 13,99 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC       | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|----------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 4418,00  | 8  | 552,25 | 2,65 | 0,0197  |
| Tratamiento | 4418,00  | 8  | 552,25 | 2,65 | 0,0197  |
| Error       | 8342,47  | 40 | 208,56 |      |         |
| Total       | 12760,47 | 48 |        |      |         |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=29,08837

| Caso | Tratamiento | Medias | Columna5 | Columna6 |
|------|-------------|--------|----------|----------|
| 1    | T7          | 87,18  | A        |          |
| 2    | T8          | 93,77  | A        | B        |
| 3    | T4          | 96,09  | A        | B        |
| 4    | T1          | 98,95  | A        | B        |
| 5    | T6          | 101,72 | A        | B        |
| 6    | T2          | 102,41 | A        | B        |
| 7    | T5          | 106,94 | A        | B        |
| 8    | T3          | 114,45 | A        | B        |
| 9    | T9          | 121,98 |          | B        |

**Tabla 9A.** Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 48 horas de incubación por INFOSTAD.

| Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| mlgas/Ms incubada | 48 | 0,33           | 0,19              | 14,98 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC       | gl | CM     | F    | p-valor |
|-------------|----------|----|--------|------|---------|
| Modelo      | 6975,92  | 8  | 871,99 | 2,35 | 0,0362  |
| Tratamiento | 6975,92  | 8  | 871,99 | 2,35 | 0,0362  |
| Error       | 14467,56 | 39 | 370,96 |      |         |
| Total       | 21443,49 | 47 |        |      |         |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=39,41604

| Caso | Tratamiento | Medias | Columna5 | Columna6 |
|------|-------------|--------|----------|----------|
| 1    | T8          | 115,89 | A        |          |
| 2    | T7          | 119,04 | A        |          |
| 3    | T4          | 120,66 | A        |          |
| 4    | T1          | 123,12 | A        |          |
| 5    | T6          | 123,78 | A        |          |
| 6    | T2          | 127,80 | A        | B        |
| 7    | T3          | 133,43 | A        | B        |
| 8    | T5          | 133,83 | A        | B        |
| 9    | T9          | 163,81 |          | B        |

**Tabla 10A.** Análisis de la varianza de producción de gas metano. después de 72 horas de incubación por INFOSTAD

| Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| mlgas/Ms incubada | 43 | 0,58           | 0,48              | 12,00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC       | gl | CM      | F    | p-valor |
|-------------|----------|----|---------|------|---------|
| Modelo      | 16199,34 | 8  | 2024,92 | 5,81 | 0,0001  |
| Tratamiento | 16199,34 | 8  | 2024,92 | 5,81 | 0,0001  |
| Error       | 11859,84 | 34 | 348,82  |      |         |
| Total       | 28059,18 | 42 |         |      |         |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=40,15668

| Caso | Tratamiento | Medias | Columna5 | Columna6 |
|------|-------------|--------|----------|----------|
| 1    | T7          | 134,92 | A        |          |
| 2    | T8          | 139,92 | A        |          |
| 3    | T6          | 140,37 | A        |          |
| 4    | T1          | 145,96 | A        |          |
| 5    | T3          | 149,29 | A        |          |
| 6    | T5          | 156,54 | A        |          |
| 7    | T4          | 156,96 | A        |          |
| 8    | T2          | 170,39 | A        | B        |
| 9    | T9          | 200,86 |          | B        |

**Tabla 11A.** Análisis de la varianza de población protozoaria. después de 12 horas de incubación por INFOTAD

| Variable  | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----------|----|----------------|-------------------|-------|
| protozoos | 53 | 0,76           | 0,72              | 11,43 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC     | gl | CM    | F     | p-valor |
|-------------|--------|----|-------|-------|---------|
| Modelo      | 191,12 | 8  | 23,89 | 17,47 | <0,0001 |
| Tratamiento | 191,12 | 8  | 23,89 | 17,47 | <0,0001 |
| Error       | 60,17  | 44 | 1,37  |       |         |
| Total       | 251,28 | 52 |       |       |         |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,22577

Error: 1,3674 gl: 44

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |     |
|-------------|--------|---|------|---|-----|
| T8          | 7,50   | 6 | 0,48 | A |     |
| T5          | 8,50   | 6 | 0,48 | A | B   |
| T1          | 8,83   | 6 | 0,48 | A | B   |
| T2          | 9,00   | 5 | 0,52 | A | B   |
| T4          | 10,00  | 6 | 0,48 |   | B C |
| T9          | 10,33  | 6 | 0,48 |   | B C |
| T6          | 11,83  | 6 | 0,48 |   | C D |
| T3          | 12,17  | 6 | 0,48 |   | C D |
| T7          | 13,67  | 6 | 0,48 |   | D   |

**Tabla 12A.** Análisis de la varianza de población protozoaria. después de 24 horas de incubación por INFOTAD

| Variable  | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----------|----|----------------|-------------------|------|
| protozoos | 53 | 0,96           | 0,96              | 8,34 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC      | gl | CM     | F      | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|--------|---------|
| Modelo      | 1592,64 | 8  | 199,08 | 140,08 | <0,0001 |
| Tratamiento | 1592,64 | 8  | 199,08 | 140,08 | <0,0001 |
| Error       | 62,53   | 44 | 1,42   |        |         |
| Total       | 1655,17 | 52 |        |        |         |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,26913

Error: 1,4212 gl: 44

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |   |     |
|-------------|--------|---|------|---|-----|
| T6          | 7,83   | 6 | 0,49 | A |     |
| T8          | 9,33   | 6 | 0,49 | A |     |
| T2          | 9,60   | 5 | 0,53 | A | B   |
| T9          | 11,83  | 6 | 0,49 |   | B C |
| T3          | 14,00  | 6 | 0,49 |   | C D |
| T7          | 14,67  | 6 | 0,49 |   | D   |
| T4          | 15,17  | 6 | 0,49 |   | D   |
| T5          | 18,83  | 6 | 0,49 |   | E   |
| T1          | 26,67  | 6 | 0,49 |   | F   |



Figura 1A. Frascos ámbar para incubación de materia seca *in vitro*



Figura 2A. Preparación de pesos de muestras para incubación *in vitro*



Figura 3A. Reactivos para preparación de saliva artificial

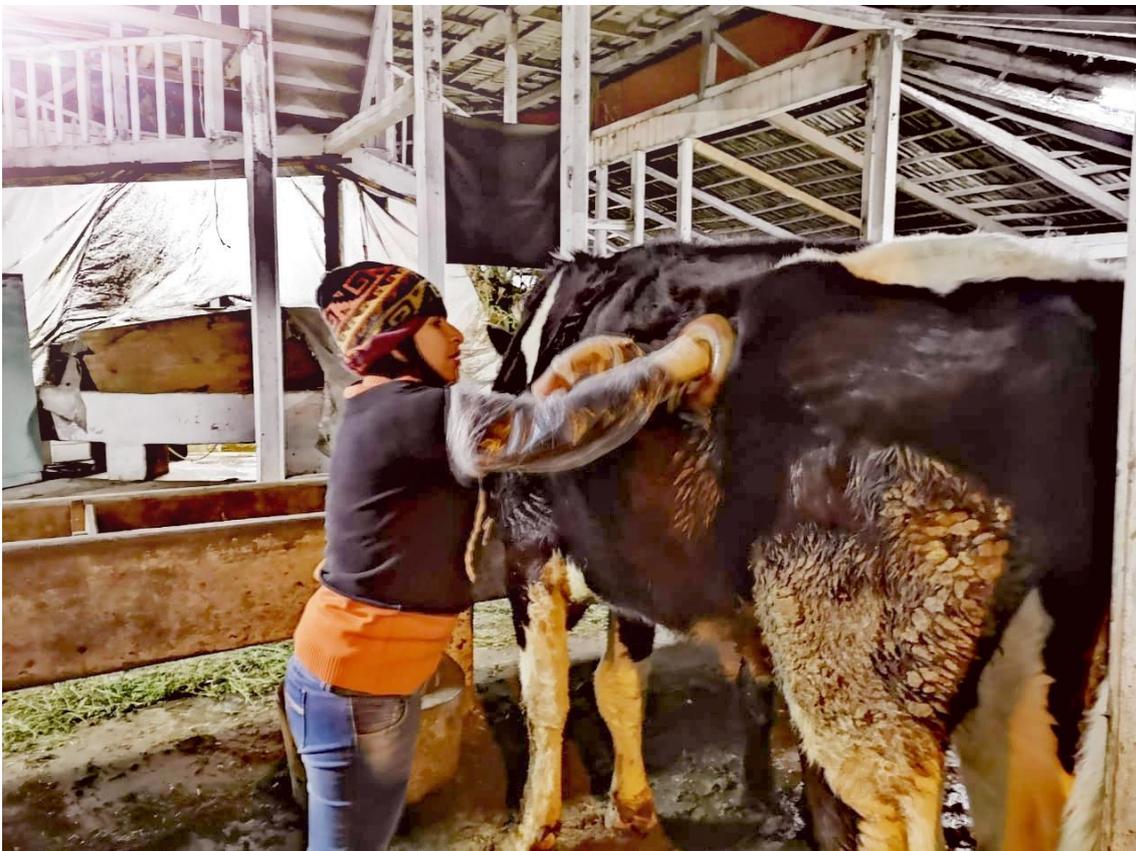


Figura 4A. Obtención de líquido ruminal



Figura 5A. Preparación de saliva artificial



Figura 6A. Saliva artificial en baño maría. aplicando dióxido de carbono



Figura 7A. Toma de volumen y presión de gas metano



Figura 8A. Transductor de presión DELTA OHM



Figura 9A. Monitor multigas. verificación de gas metano y dióxido de carbono



Figura 10A. Materia secas incubadas *in vitro*



Figura 11A. Materias secas incubadas en estufa para obtención de protozoos



Figura 12A. Extracción de materia seca incubada para visualización de protozoos



Figura 13A. Muestras colocadas en micro tubos y aplicación de azul metileno



Figura 14A. Limpieza de cámara Neubauer

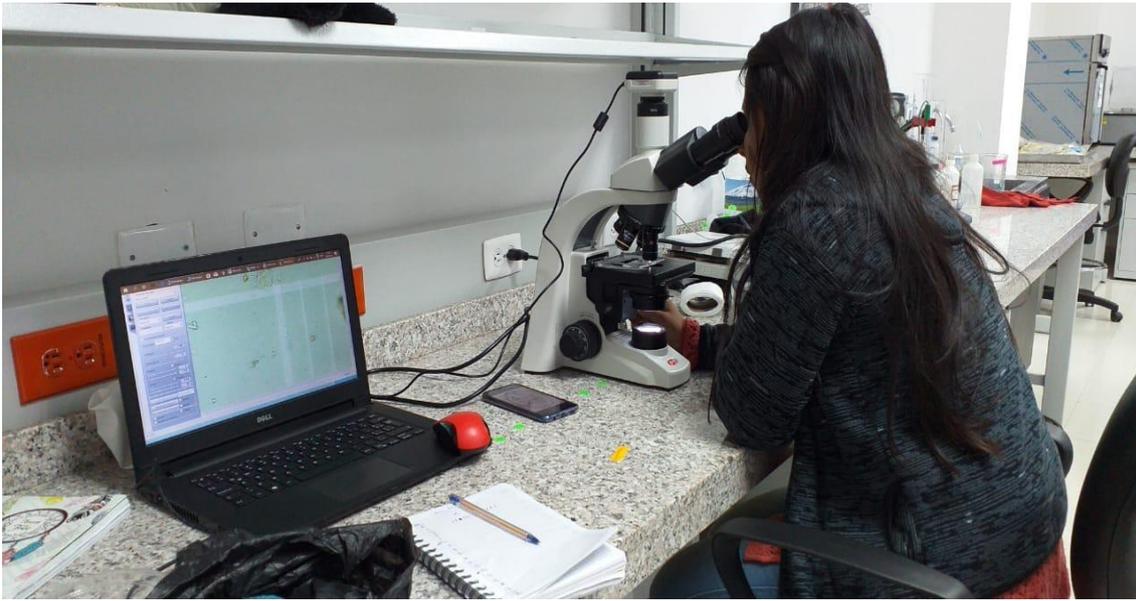


Figura 15A. Contabilización de protozoos

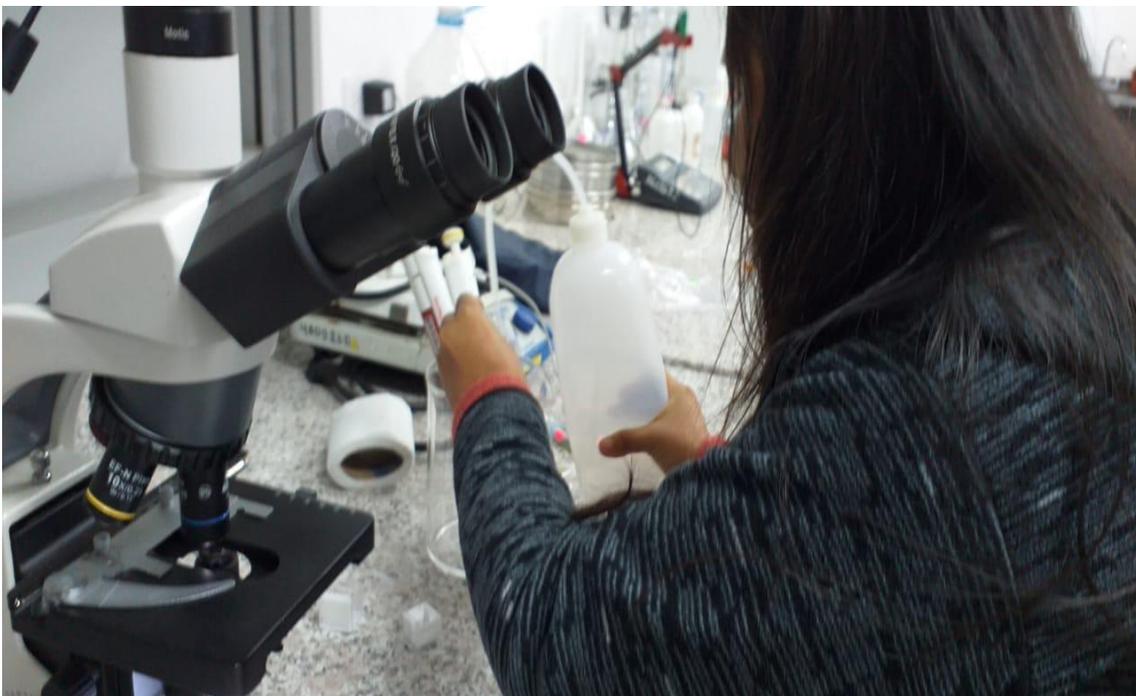


Figura 16A. Utilización de microscopio óptico



Figura 17A. Protozoo holotrico encontrado en las materias secas incubadas *in vitro*



Figura 18. Protozoo entodiniomorfo encontrado en las materias secas incubadas *in vitro*