

Estimación *in vitro* de gases con efecto invernadero en frutos y follaje de árboles de un bosque seco tropical de Venezuela

In vitro estimation of greenhouse gases in tree fruits and foliage from a tropical dry forest of Venezuela

R. Ramírez¹, P. Pizzani¹, Giovanna De Martino¹, D. García², Zoraida Linares³, O. Colmenares¹ y C. Domínguez¹

¹ Universidad Rómulo Gallegos, Área de Agronomía, Instituto para el Desarrollo Sostenible de Sistemas Agroambientales (IDESSA), San Juan de Los Morros, estado Guárico, Venezuela
E-mail: pablopizzanic@gmail.com

² Universidad de Los Andes, Núcleo Trujillo, Venezuela

³ Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Laboratorio de Nutrición Animal, Maracay, estado Aragua, Venezuela

Resumen

Con el objetivo de estimar la producción de gases con efecto invernadero (GEI) en el follaje y los frutos de *Calliandra cruegeri*, *Guazuma ulmifolia*, *Vachellia macracantha*, *Senna robiniiifolia*, *Samanea saman*, *Lonchocarpus* sp., *Fagara* sp., *Senna espectabilis*, *Mangifera indica* y *Oyedaea verbesinoides*, de un bosque seco tropical de Venezuela, se evaluaron estas especies a través de la técnica *in vitro* de producción de gas; se cuantificó la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y se estimaron los GEI. Los sustratos que registraron una mayor producción ($P<0,05$) de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) correspondieron a los frutos de *S. saman* (4,0 y 8,5), *Fagara* sp. (3,2 y 6,9) y *G. ulmifolia* (2,9 y 7,2), y al follaje de *S. saman* (3,6 y 8,2), *S. robiniiifolia* (4,0 y 9,9) y *V. macracantha* (2,8 y 5,8). La menor cantidad ($P<0,05$) de CH_4 y CO_2 la produjeron los frutos de *S. espectabilis* (2,3 y 5,0) y *Lonchocarpus* sp. (2,3 y 5,9), y el follaje de: *Fagara* sp. (1,5 y 3,7), *G. ulmifolia* (1,4 y 3,5), *C. cruegeri* (1,6 y 4,0), *M. indica* (1,7 y 4,1), *O. verbesinoides* (1,8 y 4,2) y *Cassia* sp. (1,9 y 4,6). La producción de GEI y el tiempo de incubación estuvieron correlacionados con la producción de metano ($r=0,458$; $P<0,05$). Se concluye que, de todas las especies, *S. saman* registró los mayores valores ($P<0,05$) de producción de GEI en los frutos y el follaje. Asimismo, entre las tres y ocho horas de incubación de los sustratos, la tasa de producción de GEI fue alta.

Palabras clave: Árboles, dióxido de carbono, ganado bovino, metano

Abstract

In order to estimate the production of greenhouse gases (GHG) in the foliage and fruits of *Calliandra cruegeri*, *Guazuma ulmifolia*, *Vachellia macracantha*, *Senna robiniiifolia*, *Samanea saman*, *Lonchocarpus* sp., *Fagara* sp., *Senna espectabilis*, *Mangifera indica* and *Oyedaea verbesinoides*, from a tropical dry forest of Venezuela, these species were evaluated through the *in vitro* gas production technique; the production of volatile fatty acids (VFA) was quantified and the GHGs were estimated. The substrata that recorded the highest production ($P<0,05$) of methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) corresponded to the fruits of *S. saman* (4,0 and 8,5), *Fagara* sp. (3,2 and 6,9) and *G. ulmifolia* (2,9 and 7,2) and the foliage of *S. saman* (3,6 and 8,2), *S. robiniiifolia* (4,0 and 9,9) and *V. macracantha* (2,8 and 5,8). The lowest quantity ($P<0,05$) of CH_4 and CO_2 was produced by the fruits of *S. espectabilis* (2,3 and 5,0) and *Lonchocarpus* sp. (2,3 and 5,9), and the foliage of *Fagara* sp. (1,5 and 3,7), *G. ulmifolia* (1,4 and 3,5), *C. cruegeri* (1,6 and 4,0), *M. indica* (1,7 and 4,1), *O. verbesinoides* (1,8 and 4,2) and *Cassia* sp. (1,9 and 4,6). The GHG production and incubation time were correlated to methane production ($r=0,458$; $P<0,05$). It is concluded that, among all species, *S. saman* recorded the highest values ($P<0,05$) of GHG production in the fruits and foliage. Likewise, between three and eight hours of incubation of the substrata, the GHG production rate was high.

Key words: Carbon dioxide, cattle, methane, trees

Introducción

La acumulación de GEI en la atmósfera sugiere un incremento en la temperatura de la superficie terrestre de 1 a 6°C durante el presente siglo (IPCC, 2007). El metano, que constituye el 16% del total de las emisiones globales de GEI (Scheehle y Kruger, 2006), es especialmente perjudicial, ya que tiene un potencial de calentamiento 21 veces mayor que el CO₂ (IPCC, 2007). Las emisiones de CH₄ provenientes de las actividades agrícolas representan alrededor del 40% de las producidas por las actividades humanas (Steinfeld *et al.*, 2006), y el mayor aporte (25%) proviene de la fermentación entérica ruminal (Olivier *et al.*, 1999), ya que los sustratos alimenticios ingeridos por los rumiantes son fermentados hasta generar ácidos grasos volátiles (AGV), gases de efecto invernadero (CO₂ y CH₄) y células microbianas.

El gas directo se produce principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato, mientras que la producción de propionato sólo genera gas indirecto. Por tanto, las variaciones en la proporción de los diferentes AGV, relacionadas con el tipo de sustrato fermentado, pueden originar diferencias en el volumen de gas (Blümmel y Ørskov, 1993). Es importante señalar que la producción de metano en el rumen tiene un costo, el cual se manifiesta en pérdidas energéticas, ya que una porción de alimento del animal se convierte en CH₄, y es expelido como gas (DeRamus *et al.*, 2003). Las emisiones de metano de origen entérico ruminal a la atmósfera varían en función de las especies de rumiantes: en el ganado lechero desde 5,5 hasta 9,0% y en el ganado de engorde de 3,5 a 6,5%. En el caso de los búfalos, las pérdidas de energía de la dieta en forma de metano fluctúan desde 7,5 hasta 9,0%. La estimación de las pérdidas de metano de los rumiantes también varía en dependencia de la ubicación geográfica, la calidad del alimento, el consumo y la composición de los alimentos (Johnson y Ward, 1996). En tal sentido, es importante cuantificar las emisiones de GEI producto de la fermentación entérica ruminal, para diseñar estrategias que reduzcan la producción de estos gases. La téc-

Introduction

GHG accumulation in the atmosphere suggests an increase in the temperature of the Earth surface from 1 to 6°C during this century (IPCC, 2007). Methane, which constitutes 16% of the total global GHG emissions (Scheehle and Kruger, 2006), is especially damaging, because its warming potential is 21 times higher than CO₂ (IPCC, 2007). CH₄ emissions from agricultural activities represent approximately 40% of the ones produced by human activities (Steinfeld *et al.*, 2006), and the highest contribution (25%) is from ruminal enteric fermentation (Olivier *et al.*, 1999), because the feeding substrata ingested by ruminants are fermented until generating volatile fatty acids (VFA), greenhouse gases (CO₂ and CH₄), and microbial cells.

The direct gas is produced mainly when the substratum is fermented to acetate and butyrate, while propionate production only generates indirect gas. Thus, variations in the proportion of different VFA, related to the type of fermented substratum, may originate differences in gas volume (Blümmel and Ørskov, 1993). It is important to state that methane production in the rumen has a cost, which is shown in energy losses, because a feed portion of the animal becomes CH₄ and is expelled as gas (DeRamus *et al.*, 2003). Methane emissions of ruminal enteric origin to the atmosphere vary regarding the ruminant species: in dairy cattle from 5,5 to 9,0% and in fattening cattle from 3,5 to 6,5%. In the case of buffaloes, energy losses from the diet as methane fluctuate between 7,5 and 9,0%. The estimation of methane losses in ruminants also varies depending on the geographical location, feed quality, intake and composition (Johnson and Ward, 1996). In that sense, it is important to quantify the GHG emissions due to ruminal enteric fermentation, to design strategies which reduce the production of these gases. The *in vitro* production technique, proposed by Menke and Steingass (1988), offers an alternative by allowing several diets and their combinations to be simultaneously evaluated.

The reduction of global methane emissions is an important part of any effort to decrease

nica de producción *in vitro*, propuesta por Menke y Steingass (1988), ofrece una alternativa al permitir que varias dietas y sus combinaciones sean evaluadas de forma simultánea.

La reducción de las emisiones globales de metano es una parte importante de cualquier esfuerzo para disminuir las emisiones antropogénicas de GEI. Sin embargo, el decremento en el número de rumiantes no parece ser una opción, debido a la creciente demanda mundial de carne y leche, las cuales se duplicarán para el año 2050 (FAO, 2008). Es por ello que la manipulación de las dietas a través de la adición de lípidos poliinsaturados (Johnson y Johnson, 1995); el uso de antibióticos ionóforos (Beauchemin y McGinn, 2006); el conocimiento filogenético de las bacterias metanogénicas (Buddle *et al.*, 2011); las dietas ricas en almidón (Moss *et al.*, 2000) y la mejora en la calidad de las pasturas, así como las prácticas agrosilvopastoriles (donde se incorporen leguminosas ricas en taninos y otras especies arbóreas en la alimentación de los rumiantes), podrían contribuir a la reducción de las emisiones de GEI de origen digestivo (DeRamus *et al.*, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue estimar la producción de GEI en algunos sustratos (follaje y frutos) de las especies de árboles de interés forrajero, de un bosque seco tropical deciduo de Venezuela.

Materiales y Métodos

Ubicación y toma de muestras. El área en estudio se conoce como bosque seco tropical deciduo, localizado a 9°50' - 9°55' de latitud Norte y 67°30' - 67°22' de longitud Este, municipio Juan Germán Roscio, Parroquia San Juan de los Morros, estado Guárico. Según los datos de la estación meteorológica de San Juan de los Morros, las características climatológicas del área son: temperatura máxima de 35,7°C para el mes de marzo y mínima de 17°C para diciembre, y la humedad máxima y mínima promedio de 98 y 31%, respectivamente. En el área seleccionada se trazaron transeptos de 10 x 100 m, equivalentes a 1 000 m².

anthropogenic GHG emissions. Yet, the decrease in ruminant numbers does not seem to be a choice, because of the increasing world demand of meat and milk, which will be doubled by 2050 (FAO, 2008). For such reason, diet manipulation through the addition of polyunsaturated lipids (Johnson and Johnson, 1995); the use of ionophore antibiotics (Beauchemin and McGinn, 2006); the phylogenetic knowledge of methanogenic bacteria (Buddle *et al.*, 2011); starch-rich diets (Moss *et al.*, 2000) and the improvement of pasture quality, as well as agrosilvopastoral practices (where tannin-rich legumes and other tree species are incorporated to ruminant feeding), could contribute to reduce GHG emissions of digestive origin (DeRamus *et al.*, 2003).

The objective of this work was to estimate GHG production in some substrata (foliage and fruits) of forage tree species, from a tropical dry forest in Venezuela.

Materials and Methods

Location and sampling. The studied area is known as tropical deciduous dry forest, located at 9°50' - 9°55' latitude north and 67°30' - 67°22' longitude east, Juan Germán Roscio municipality, San Juan de los Morros Parish, Guárico state. According to the data of the San Juan de los Morros meteorological station, the climate characteristics of the area are: maximum temperature 35,7°C for March and minimum 17°C for December, and maximum and minimum average humidity, 98 and 31%, respectively. In the selected area 10 x 100 m transepts were outlined equivalent to 1 000 m².

Samples of the species *Calliandra cruegeri*, *Guazuma ulmifolia*, *Vachellia macracantha*, *Senna robiniiifolia*, *Samanea saman*, *Lonchocarpus* sp., *Fagara* sp., *Senna spectabilis*, *Mangifera indica*, *Cassia* sp. and *Oyedaea verbessinoides* were taken. The collection of plant samples was conducted during July-September, according to fructification. The plant material was placed in paper bags and dried at 55°C.

Gas production and kinetic parameters. The forest foliage and fruits were evaluated by

Se tomaron muestras de las especies: *Calliandra cruegeri*, *Guazuma ulmifolia*, *Vachellia macracantha*, *Senna robiniiifolia*, *Samanea saman*, *Lonchocarpus* sp., *Fagara* sp., *Senna spectabilis*, *Mangifera indica*, *Cassia* sp. y *Oyedaea verbesinoides*. La recolección de las muestras vegetales se realizó durante los meses de julio a septiembre, de acuerdo con la fructificación. El material vegetal se colocó en bolsas de papel y se secó a 55°C.

Producción de gas y parámetros cinéticos. El follaje y los frutos del bosque fueron evaluados por la técnica de producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass, 1988), donde la cantidad de gas generado por los microorganismos del rumen en contenedores cerrados, en el proceso fermentativo de un sustrato, se correlaciona con la cantidad de sustrato degradado en el tiempo. El inóculo se obtuvo del contenido ruminal de tres vacunos adultos a nivel de sala de matanza, alimentados con forraje. El licor ruminal se trasladó en un termo precalentado a 39°C. Los tiempos de incubación fueron de: 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Los parámetros de cinética de producción de gases se obtuvieron mediante el empleo de un modelo no lineal desarrollado por France *et al.* (1993), a través del procedimiento NLIN de SAS (1985) para el siguiente modelo: $y = a [1 - \exp(-b(t-T)-c(\sqrt{t} - \sqrt{T}))]$, donde: y, representa la producción total de gas al tiempo de incubación; t, es la producción potencial de gas (mL); b, describe la tasa fraccional de producción de gas (mL/h); y c, es la tasa constante de producción de gas ($h^{-1/2}$).

Nitrógeno amoniacal, ácidos grasos volátiles y GEI (CO_2 y CH_4). Para las determinaciones de N-amoniacal y AGV se tomaron tres muestras de licor ruminal por sustrato incubado. El contenido de nitrógeno amoniacal se determinó a través del método colorimétrico desarrollado por Weatherburn (1967), el cual se fundamenta en la formación de un cromóforo azul, resultante de un complejo fenol-hipoclorito-N-amonio; esta reacción es altamente específica para el N-amoniacal. Las concentraciones de los AGV se evaluaron siguiendo la metodología descrita por Thurnofer y Vetter (2005).

the *in vitro* gas production technique (Menke and Steingass, 1988), where the quantity of gas generated by rumen microorganisms in airtight containers, in the fermentative process of a substratum, is correlated to the quantity of substratum degraded in time. The inoculum was obtained from the rumen content of three adult cattle individuals at slaughterhouse, fed with forage. The rumen liquor was transferred in a thermos pre-heated at 39°C. The incubation times were 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 hours.

The kinetics parameters of gas production were obtained by using a non lineal model developed by France *et al.* (1993), through the NLIN procedure of SAS (1985) for the following model: $y = a [1 - \exp(-b(t-T)-c(\sqrt{t} - \sqrt{T}))]$, where: y, represents total gas production at the incubation time; t, is the potential gas production (mL); b, describes the fractional gas production rate (mL/h); and c, is the constant gas production rate ($h^{-1/2}$).

Ammoniacal nitrogen, volatile fatty acids and GHG (CO_2 and CH_4). For the determinations of ammoniacal N and VFA, three samples of rumen liquor per incubated substratum were taken. The ammoniacal nitrogen content was determined through the colorimetric method developed by Weatherburn (1967), which is based on the formation of a blue chromophore, resulting from a phenol-hypochlorite-N-ammonium complex; this reaction is highly specific for ammoniacal N. The VFA concentrations were evaluated following the methodology described by Thurnofer and Vetter (2005).

The quantity and molar proportion of acetate (a), propionate (p) and butyrate (b) determined the moles of CO_2 and CH_4 produced. Wolin's stoichiometry (1960) assumes that the net oxidation balance of all the products equals zero ($a + p + b + CO_2 + CH_4 = 0$), that CO_2 and CH_4 are generated only from acetate and butyrate, and twice the quantity of CO_2 and CH_4 is generated from the butyrate formation ($CO_2 + CH_4 = a + 2b$). After some substitutions, the resulting equation is: $CO_2 = a/2 + p/4 + 1,5*b$. Thus the CO_2 moles produced can be calculated

La cantidad y la proporción molar de acetato (a), propionato (p) y butirato (b) determinan los moles de CO_2 y CH_4 producidos. La estequiometría de Wolin (1960) asume que el balance de oxidación neta de todos los productos es igual a cero ($a + p + b + \text{CO}_2 + \text{CH}_4 = 0$), que el CO_2 y el CH_4 son producidos únicamente desde el acetato y el butirato, y el doble de la cantidad de CO_2 y CH_4 es generada desde la formación de butirato ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4 = a + 2b$). Después de algunas sustituciones, la ecuación resultante es: $\text{CO}_2 = a/2 + p/4 + 1,5*b$. Así, los moles de CO_2 producidos pueden ser calculados desde la cantidad y proporción molar de acetato, propionato y butirato, y una vez conocidos los moles de CO_2 , los moles de CH_4 pueden ser calculados de acuerdo con $\text{CH}_4 = (a + 2b) - \text{CO}_2$ (Makkar, 2001).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con seis réplicas por especie. A las variables estudiadas se les aplicó un análisis de varianza unifactorial. Los frutos y el follaje de las diferentes especies constituyeron la fuente de variación. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows, utilizando la prueba de comparación de Duncan para $P < 0,05$. Las correlaciones lineales se realizaron con el mismo paquete estadístico, y se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se presentan los valores de producción acumulada de gas *in vitro* y los parámetros de la cinética de fermentación, en los sustratos evaluados. Los frutos de *G. ulmifolia* y *Lonchocarpus* sp. mostraron la mayor producción ($P < 0,05$) potencial *in vitro* de gas, en correspondencia con una alta tasa de fermentación ($P < 0,05$). En el caso del follaje, este contiene una importante fracción no digerible en comparación con los frutos forrajeros ricos en azúcares, componente de alta solubilidad y fermentación.

En la tabla 2 se muestra la producción de AGV y GEI para los frutos y el follaje. La relación proporcional [acético + butírico]/propiónico para

from the quantity and molar proportion of acetate, propionate and butyrate, and once the CO_2 moles are known, the CH_4 moles can be calculated according to $\text{CH}_4 = (a + 2b) - \text{CO}_2$ (Makkar, 2001).

Statistical analysis. A completely randomized design was used with three replications per species. A one-way variance was applied to the studied variables. The fruits and foliage from the different species constituted the variation source. The data analysis was made through the statistical pack SPSS version 10.0 for Windows, using Duncan's comparison test for $P < 0,05$. The lineal correlations were made with the same statistical pack, and Pearson's correlation coefficient was used.

Results and Discussion

Table 1 shows the values of cumulative *in vitro* gas production and the parameters of the fermentation kinetics, in the evaluated substrata. The fruits from *G. ulmifolia* and *Lonchocarpus* sp. had the highest ($P < 0,05$) potential *in vitro* gas production, in correspondence with a high fermentation rate ($P < 0,05$). In the case of the foliage, it contains an important non-digestible fraction as compared to the forage fruits rich in sugar, component of high solubility and fermentation.

Table 2 shows the VFA and GHG production for the fruits and foliage. The proportional [acetic + butyric]/propionic ratio for these substrata was 3,56 and 2,51, respectively. The formation of acetic acid was parallel to that of hydrogen (4 moles of H/mol of acetic), while the synthesis of propionic acid implied hydrogen uptake (2 moles of H/mol of propionic). Thus, CH_4 emissions increased parallel to the [acetate + butyrate]/propionate ratio, formed in the rumen (Moss *et al.*, 2000).

The substrata that recorded the highest production ($P < 0,05$) of CH_4 and CO_2 (mmoles/day) corresponded to the fruits from *S. saman* (4,0 and 8,5), *Fagara* sp. (3,2 and 6,9) and *G. ulmifolia* (2,9 and 7,2) and the foliage of *S. saman* (3,6 and 8,2), *S. robinifolia* (4,0 and 9,9) and *V. macracantha* (2,8 and 5,8). The lowest

Tabla 1. Producción acumulada de gas *in vitro* y parámetros de su cinética de fermentación en los frutos y el follaje.
Table 1. Cumulative *in vitro* gas production and parameters of its fermentation kinetics in the fruits and foliage.

	Producción acumulada de gas							NH ₃
	3	6	12	24	48	96	a	
Sustrato (Fruto)	mL/g MS						mL	mg/L
<i>Samanea saman</i>	20,0 ^f	43,3 ^f	90,0 ^c	150,0 ^c	183,3 ^c	206,7 ^b	202,8 ^{ab}	0,06 ^b
<i>Senna spectabilis</i>	25,0 ^e	41,7 ^{fe}	66,7 ^{de}	106,7 ^e	145,0 ^{de}	176,7 ^{cd}	185,2 ^c	0,03 ^e
<i>Guazuma ulmifolia</i>	50,0 ^b	81,7 ^b	121,7 ^b	168,3 ^b	196,7 ^b	226,7 ^a	226,7 ^a	0,04 ^d
<i>Lonchocarpus</i> sp.	40,0 ^c	76,7 ^c	136,7 ^a	181,7 ^a	210,0 ^a	233,3 ^a	224,9 ^a	0,07 ^a
<i>Fagara</i> sp.	63,3 ^a	95,0 ^a	130,0 ^a	166,7 ^b	191,7 ^b	211,7 ^b	210,3 ^{ab}	0,03 ^e
Promedio	39,66	67,68	109,02	154,68	161,34	211,02	209,98	0,05
EE $\pm$	6,63	9,23	12,36	11,96	10,57	10,74	10,42	27,64
Sustrato (Follaje)								
<i>Vachellia macracantha</i>	23,3 ^{ef}	41,7 ^{fe}	76,7 ^d	110,0 ^e	113,3 ^f	150,0 ^f	147,7 ^d	0,03 ^e
<i>Senna robiniiifolia</i>	28,3 ^{de}	50,0 ^d	68,3 ^{de}	103,3 ^e	140,0 ^d	166,7 ^e	178,9 ^c	0,02 ^f
<i>Samanea saman</i>	30,0 ^d	51,7 ^d	78,3 ^d	105,0 ^e	128,3 ^f	148,3 ^f	148,4 ^d	0,03 ^e
<i>Guazuma ulmifolia</i>	8,3 ^h	16,7 ^j	35,0 ^{gh}	56,7 ⁱ	81,7 ^h	96,7 ⁱ	111,4 ^f	0,06 ^b
<i>Calliandra cruegeri</i>	15,0 ^g	48,3 ^{de}	76,7 ^d	125,0 ^d	148,3 ^{bd}	163,3 ^e	159,5 ^d	0,07 ^a
<i>Cassia</i> sp.	8,3 ^h	16,7 ^j	53,3 ^f	71,7 ^{gh}	115,0 ^f	135,0 ^{fg}	139,5 ^e	0,04 ^d
<i>Mangifera indica</i>	8,3 ^h	11,7 ^j	23,3 ^h	75,0 ^{gh}	153,3 ^b	181,7 ^c	199,4 ^b	0,04 ^d
<i>Oyedaea verbesinoides</i>	8,3 ^h	18,3 ^j	38,3 ^g	80,0 ^{fg}	98,3 ^g	113,3 ^h	145,8 ^d	0,01 ^g
<i>Fagara</i> sp.	6,6 ^h	10,0 ^j	25,0 ^h	95,0 ^{ef}	148,3 ^{bd}	176,7 ^{cd}	185,1 ^c	0,05 ^c
Promedio	15,16	29,46	52,77	91,30	125,17	147,97	157,30	0,04
EE $\pm$	2,96	5,75	7,51	7,02	7,51	8,69	8,33	27,98

a: producción potencial de gas (mL); b: tasa fraccional de producción de gas (mL*h⁻¹)

Superíndices no comunes difieren a P<0,05 (Duncan, 1955)

estos sustratos fue de 3,56 y 2,51, respectivamente. La formación de ácido acético fue paralela a la de hidrógeno (4 moles de H/mol acético), mientras que la síntesis de ácido propiónico implicó la captura de hidrógeno (2 moles de H/mol propiónico). De esta forma, las emisiones de CH₄ aumentaron paralelamente a la relación [acetato + butirato]/propionato, formado en el rumen (Moss *et al.*, 2000).

Los sustratos que registraron la mayor producción (P<0,05) de CH₄ y CO₂ (mmoles/día) correspondieron a los frutos de *S. saman* (4,0 y 8,5), *Fagara* sp. (3,2 y 6,9) y *G. ulmifolia* (2,9 y 7,2), y al follaje de *S. saman* (3,6 y 8,2), *S. robiniiifolia* (4,0 y 9,9) y *V. macracantha* (2,8 y 5,8). La menor cantidad (P<0,05) de CH₄

quantity (P<0,05) of CH₄ and CO₂ was produced by the fruits of *S. spectabilis* (2,3 and 5,0) and *Lonchocarpus* sp. (2,3 and 5,9), and the foliage of *Fagara* sp. (1,5 and 3,7), *G. ulmifolia* (1,4 and 3,5), *C. cruegeri* (1,6 and 4,0), *M. indica* (1,7 and 4,1), *O. verbesinoides* (1,8 and 4,2) and *Cassia* sp. (1,9 and 4,6). This discrepancy (P<0,05) between methane generation in the fruits and the foliage could be related to the type of fermented carbohydrate. Soluble carbohydrates, known as pectins, have high energy content and are rapidly fermented, but unlike starch, acetate is the main product of their fermentation (Van Soest, 1982); consequently, the methane emissions of some forage fruits would be higher than those of foliage.

Tabla 2. Producción de ácidos grasos volátiles y gases con efecto invernadero.
Table 2. Production of volatile fatty acids and greenhouse gasses.

	Acetato (a)	Propionato (p)	Butirato (b)	[acetato+butirato] /Propionato	CO ₂	CH ₄
Sustrato (Fruto)			(mmoles/día)			
<i>Samanea saman</i>	6,3 ^{ab}	2,9 ^b	3,1 ^{ab}	3,2 ^b	8,5 ^{ab}	4,0 ^a
<i>Senna spectabilis</i>	4,1 ^{ab}	2,4 ^{bc}	1,6 ^c	2,4 ^{bc}	5,0 ^{cd}	2,3 ^{cd}
<i>Guazuma ulmifolia</i>	3,35 ^{ab}	1,9 ^{bc}	3,35 ^a	3,5 ^b	7,2 ^{ab}	2,9 ^{bc}
<i>Lonchocarpus sp</i>	4,1 ^{ab}	1,2 ^c	2,4 ^{abc}	5,4 ^a	5,9 ^{cd}	2,3 ^{cd}
<i>Fagara sp</i>	5,0 ^{ab}	2,3 ^{bc}	2,6 ^{abc}	3,3 ^b	6,9 ^{ab}	3,2 ^b
Promedio	4,57	2,14	2,61	3,56	6,70	2,94
EE $\pm$	0,47	0,23	0,31	0,52	0,62	0,31
Sustrato (Follaje)						
<i>Vachellia macracantha</i>	3,8 ^{ab}	1,2 ^c	2,4 ^{abc}	5,2 ^a	5,8 ^{bc}	2,8 ^{bc}
<i>Senna robiniiifolia</i>	6,9 ^a	4,9 ^a	3,5 ^c	2,1 ^b	9,9 ^a	4,0 ^a
<i>Samanea saman</i>	5,7 ^{ab}	3,2 ^b	3,1 ^{ab}	2,7 ^b	8,2 ^{ab}	3,6 ^{ab}
<i>Guazuma ulmifolia</i>	2,6 ^b	1,9 ^{bc}	1,2 ^c	2,0 ^b	3,5 ^{ef}	1,4 ^{fg}
<i>Calliandra cruegeri</i>	2,9 ^b	2,2 ^{bc}	1,3 ^c	2,0 ^b	4,0 ^e	1,6 ^{ef}
<i>Cassia sp.</i>	3,6 ^{ab}	2,4 ^{bc}	1,5 ^c	2,1 ^b	4,6 ^{de}	1,9 ^{de}
<i>Mangifera indica</i>	3,0 ^b	2,0 ^{bc}	1,4 ^c	2,2 ^b	4,1 ^e	1,7 ^{ef}
<i>Oyedaea verbesinoides</i>	3,2 ^b	2,1 ^{bc}	1,4 ^c	2,2 ^b	4,2 ^e	1,8 ^{ef}
<i>Fagara sp.</i>	2,7 ^b	1,8 ^{bc}	1,2 ^c	2,1 ^b	3,7 ^{ef}	1,5 ^{fg}
Promedio	3,82	2,41	1,88	2,51	5,33	2,25
EE $\pm$	0,45	0,33	0,26	0,31	0,68	0,29

Valores con superíndices no comunes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955)

y CO₂ la produjeron los frutos de *S. spectabilis* (2,3 y 5,0) y *Lonchocarpus sp.* (2,3 y 5,9), y el follaje de: *Fagara sp.* (1,5 y 3,7), *G. ulmifolia* (1,4 y 3,5), *C. cruegeri* (1,6 y 4,0), *M. indica* (1,7 y 4,1), *O. verbesinoides* (1,8 y 4,2) y *Cassia sp.* (1,9 y 4,6). Esta discrepancia ($P < 0,05$) entre la generación de metano en los frutos y el follaje podría estar relacionada con el tipo de carbohidrato fermentado. Los carbohidratos solubles, conocidos como pectinas, tienen un elevado contenido energético y son fermentados rápidamente, pero a diferencia de los almidones, el acetato es el principal producto de su fermentación (Van Soest, 1982); en consecuencia, las emisiones de metano de algunos frutos forrajeros serían mayores que las del follaje.

Similar values of CH₄ production were obtained by Hess *et al.* (2002), who stated that the tannins present in many legumes, such as *Calliandra calothyrsus*, may be associated to CH₄ reduction in up to 50% with regards to the traditional diet. However, this is not valid for all legumes of forage potential in the tropics; thus, these authors reported that *Cratylia argentea* and *Arachis pintoi* increased from three to four times the CH₄ levels in animals fed only with pasture.

The *in vitro* gas production rate, between three and eight hours of incubation (table 3), showed a significant correlation ($P < 0,05$) to CH₄ production ($r = 0,517$ and $0,458$); ammoniacal nitrogen also showed correlation to GHGs ($r = 0,769$ CH₄; $0,845$ CO₂ $P < 0,01$).

Valores similares de producción de CH₄ obtuvieron Hess *et al.* (2002), quienes señalaron que los taninos presentes en muchas leguminosas, como *Calliandra calothyrsus*, pueden estar asociados con la reducción de CH₄ de hasta un 50% respecto a la dieta tradicional. Sin embargo, ello no es válido para todas las leguminosas de potencial forrajero en el trópico; así, estos autores reportaron que *Cratylia argentea* y *Arachis pintoi* incrementaron de tres a cuatro veces los niveles de CH₄, en los animales alimentados sólo con pasto.

La tasa de producción de gas *in vitro*, entre las tres y ocho horas de incubación (tabla 3), presentó una correlación significativa ($P < 0,05$) con la producción de CH₄ ($r = 0,517$ y $0,458$); también el nitrógeno amoniacal mostró correlación con los GEI ($r = 0,769$ CH₄; $0,845$ CO₂ $P < 0,01$).

Tabla 3. Correlación entre el tiempo de incubación *in vitro* y el GEI.

Table 3. Correlation between the *in vitro* incubation time and GHG.

Horas de incubación	CO ₂	CH ₄
3	0,508*	0,517*
6	0,486*	0,496*
8	0,433	0,458*
12	0,433	0,446
24	0,363	0,393
48	0,342	0,360
72	0,352	0,374
96	0,378	0,401

* $P < 0,05$

Conclusiones

- Los sustratos de mayor producción de CH₄ fueron los frutos de *S. saman*, *Fagara* sp., *Lonchocarpus* sp. y *G. ulmifolia*; los que produjeron la menor cantidad fueron el follaje de *G. ulmifolia*, *Fagara* sp. y *C. cruegeri*.
- Los sustratos de follaje de las especies *S. robinifolia*, *S. saman* y *V. macracantha* generaron la mayor concentración de CH₄.
- Entre las tres y ocho horas de fermentación de los sustratos, la tasa de producción de gas

Conclusions

- The substrata that contributed the highest CH₄ production were the fruits from *S. saman*, *Fagara* sp., *Lonchocarpus* sp. and *G. ulmifolia*, and the lowest quantity was produced by the foliage from *G. ulmifolia*, *Fagara* sp. and *C. cruegeri*.
- The foliage substrata which generated the highest CH₄ concentrations corresponded to the species *S. robinifolia*, *S. saman* and *V. macracantha*.
- Between the three and eight hours of fermentation of the substrata, the *in vitro* gas production rate and ammoniacal nitrogen content were correlated to the production of GHGs.

--End of the English version--

in vitro y el contenido de nitrógeno amoniacal estuvieron correlacionados con la producción de GEI.

Referencias bibliográficas

- Beauchemin, K. & McGinn, S. 2006. Effects of various feed additives on the methane emissions from beef cattle. International Congress Series. Vol. 1293. Greenhouse Gases and Animal Agriculture: An Update. Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture. Zurich, Switzerland. p. 152
- Blümmel, M. & Ørskov, E. 1993. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 40:109
- Buddle, B.M. *et al.* 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188:11
- DeRamus, H. *et al.* 2003. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *Journal Environ Qual*. 32:269
- FAO. 2008. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. [Disponible en:] <http://www.fao.org/docrep/011/i0291s/i0291s00.htm>. [Consultado: 27 enero 2011]
- France, J. *et al.* 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *Journal of Theoretical Biology*. 163:99

- Hess, H. *et al.* 2002. *In vitro* evaluation of the effect of *Sapindus saponaria* on methane release and microbial populations (1.4.1). [Disponible en:] <http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/output-1>. [Consultado: 20 de marzo 2010]
- Johnson, D. & Ward, G. 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*. 42:133
- Johnson, K. & Johnson, D. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483
- Makkar, H. 2001. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. [Disponible en:] http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm. [Consultado: 18 noviembre 2010]
- Menke, K. & Steingass, H. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28:7
- Moss, A. *et al.* 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231
- Olivier, J. *et al.* 1999. Sectoral emission inventories of greenhouse gases for 1990 on a per country basis as well as on 1-1. *Environmental Science Policy*. 2:241
- SAS. 1985. SAS User's Guide: Statistics (5th ed.). Statistical Analysis Systems Institute, Inc., Cary, NC.
- Scheehle, E. & Kruger, D. 2006. Global anthropogenic methane and nitrous oxide emissions. *The Energy Journal*. Special issue:33
- Steinfeld, H. *et al.* 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. FAO. Rome, Italy. 392 p.
- Thurnofer, S. & Vetter, W. 2005 A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after the formation of fatty acid methyl esters. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8896
- Van Soest, P. 1982. Nutritional ecology of the ruminant animal. Cornell University Press. Ithaca, New York. 479 p.
- Weatherburn, H.W. 1967. Phen of hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 39:971
- Wolin, M. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452

Recibido el 8 de julio del 2011
Aceptado el 5 de septiembre del 2011