



**PRODUCCIÓN *in vitro* DE BIOGÁS, METANO Y DEGRADACIÓN DE MATERIA SECA DE DIETAS QUE INCLUYEN NIVELES CRECIENTES DE VAINA DE *Moringa oleifera***

**[*In vitro* PRODUCTION OF BIOGAS, METHANE AND DRY MATTER DEGRADATION OF DIETS THAT INCLUDE GROWING LEVELS OF *Moringa oleifera*]**

Conchita Rivera-Cristóbal<sup>1</sup>, Paulino Sánchez-Santillán<sup>2§</sup>, Nicolás Torres-Salado<sup>2</sup>, Adelaido Rafael Rojas-García<sup>2</sup>, María de los Angeles Maldonado-Peralta<sup>2</sup>, Jeronimo Herrera-Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero, México. C.P.41940. <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero, México. C.P.41940. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: (sanchezsantillan@gmail.com).

**RESUMEN**

El objetivo fue evaluar la producción parcial y acumulada de biogás y metano (CH<sub>4</sub>), así como la degradación de materia seca (DMS) y de fibra de detergente neutro (DFDN) *in vitro* de dietas para becerros con niveles crecientes de vaina *Moringa oleifera* (MO). Las dietas se formularon con base en el NRC (2000) y se caracterizaron por la inclusión creciente de vaina de MO, D1 (testigo), D2 (10 % de vaina de MO), D3 (20 % de vaina de MO) y D4 (30 % de vaina de MO). El biodigestor consistió en 0.5 g de dieta, 45 mL de medio de cultivo y 5 mL de fluido ruminal como inóculo y se incubó a 39 °C por 72 h. Las variables fueron producción parcial a las 24, 48 y 72 h, así como acumulada de biogás y CH<sub>4</sub>; además, DMS y DFDN a las 72 h. El análisis estadístico fue un diseño completamente al azar. Las dietas D2 y D3 presentaron mayor producción de biogás acumulado ( $p \leq 0.05$ ). La producción de CH<sub>4</sub> acumulado fue mayor y sin diferencias en D1, D2 y D3 ( $p > 0.05$ ). La DMS fue mayor en D1 y la DFDN disminuyó conforme aumento la inclusión de vaina de MO ( $p \leq 0.05$ ) en las dietas. Se concluye, las dietas para becerros en crecimiento que incluyen vaina de *Moringa oleifera* presentaron menor degradación de la materia seca y de la fibra detergente neutro respecto a la dieta testigo.

**Palabras clave:** Becerros, degradación fibra detergente neutro, dieta, fermentación *in vitro*, leguminosas arbóreas.

**ABSTRACT**

The objective was to evaluate the partial and accumulated production of biogas and methane (CH<sub>4</sub>), as well as the degradation of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (DNDF) *in vitro* of diets for calves with increasing levels of *Moringa oleifera* pod. Diets were formulated based on the NRC (2000) and were characterized by increasing inclusion of *Moringa oleifera* (MO) pod D1 (control), D2 (10 % MO pod), D3 (20 % MO pod) and D4 (30 % of MO pod). The biodigester consisted of 0.5 g of diet, 45 mL of culture medium and 5 mL of ruminal fluid as inoculum and incubated at 39 °C for 72 h. The variables were partial production at 24, 48 and 72 h, as well as accumulated



biogas and CH<sub>4</sub>; in addition, DMD and DNDF at 72 h. The statistical analysis was a completely random design. Diets D2 and D3 showed higher accumulated biogas production ( $p \leq 0.05$ ). The accumulated CH<sub>4</sub> production was greater and without differences in D1, D2 and D3 ( $p > 0.05$ ). The DMD was higher in D1 and the DNDF decreased as the inclusion of MO pod ( $p \leq 0.05$ ) increased in the diets. It is concluded that diets for growing calves that include *Moringa oleifera* pod showed lower degradation of dry matter and neutral detergent fiber compared to the control diet.

**Index words:** Calves, diet, *in vitro* fermentation, neutral detergent fiber degradation, tree legumes.

## INTRODUCCIÓN

En la época de sequía del trópico mexicano se produce una variedad de vainas de leguminosas y otras arbóreas que pueden usarse como complemento en los sistemas de alimentación de los rumiantes (Quintanilla *et al.*, 2018), ya que los costos de cereales o fuentes proteicas de oleaginosas en el mercado nacional e internacional son elevados para pequeños productores. Las vainas de leguminosas y otras arbóreas en general contienen hasta 30 % de proteína cruda (PC), minerales (Hernández-Morales *et al.*, 2018), carbohidratos de fácil fermentación, fibra digestible y efecto positivo en la utilización del nitrógeno en rumen (Rodríguez *et al.*, 2014). Sin embargo, las vainas contienen compuestos secundarios que modifican la digestibilidad de sus nutrientes; por ejemplo, los taninos en concentraciones elevadas limitan la productividad de los animales (Galindo *et al.*, 2005). Por lo que se requiere conocer las características fermentativas, así como su composición química para determinar ventajas y limitaciones del uso de las vainas (Hernández-Morales *et al.*, 2018) en la alimentación de rumiantes. *Moringa oleifera* es originaria del sur del Himalaya, el noreste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. Es un árbol forrajero que produce hasta 99 t ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> MS y es consumida por bovinos, ovinos y caprinos; por lo que es una alternativa viable para incrementar su uso en dietas base, principalmente para sustituir raciones comerciales debido a la relativa facilidad de la *M. oleifera* para su propagación, baja demanda de nutrientes del suelo y de agua después de su plantación; las cuales son características que hacen que su producción y manejo sean prometedores, especialmente en los países en desarrollo. La fracción comestible comparada con otros forrajes es mayor en cuanto al contenido de proteína cruda y menor en el contenido de componentes fibrosos (Quintanilla *et al.*, 2018).

La emisión de gases efecto invernadero (GEI) por fermentación entérica en rumiantes depende de factores como la composición química y fermentación ruminal. El CH<sub>4</sub> es un gas que se produce en rumen durante la fermentación por *arqueas* metanogénicas que usan bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrógeno (H<sub>2</sub>) como fuentes de energía y producen CH<sub>4</sub> como producto de fermentación (Kumar *et al.*, 2014). El principio de la técnica de producción de gas *in vitro* es simular el ambiente ruminal, bajo condiciones controladas de laboratorio (temperatura, pH, anaerobiosis y aporte de minerales) para evaluar la fermentación de diferentes sustratos (Ramírez-Mella, 2018). Esta técnica se usa ampliamente para evaluar la digestibilidad de los alimentos no convencionales en rumiantes (Sánchez-Santillán *et al.*, 2018). Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar *in vitro* la producción de biogás, metano y degradaciones de materia seca y fibra de detergente neutro en dietas que contienen hasta 30% de vaina de *Moringa oleifera*.



## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero; ubicado en el km 197 de la carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

**Dietas:** De la especie de *M. oleifera* se seleccionaron cuatro ramas al azar en cada árbol (5 árboles) y se cosecharon todas las vainas fisiológicamente maduras. Las vainas colectadas se depositaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de Nutrición Animal. La colecta de vainas se realizó en la primavera de 2018 en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero. Las dietas para becerros en crecimiento incluyeron de 0 a 30 % de vaina de *M. oleifera* (Cuadro 1). Las dietas se ajustaron según lo reportado por NRC (2000). Una vez elaboradas las dietas se deshidrataron a 60 °C por 72 h y se molieron en un molino (Thomas Willey, USA) con malla de 1 mm.

**Medio de cultivo:** Los componentes del medio fueron: 30 mL de fluido ruminal clarificado [líquido ruminal bovino fresco centrifugado 10 min a 12,857 x g y esterilizado (All American® 1941X, USA) 15 min a 121 °C y 15 psi], 5 mL de solución mineral I [6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) en 1000 mL de agua destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) + 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck®) + 12 g NaCl (SigmaAldrich®) + 2.45 g MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) + 1.6 g CaCl-2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®) en 1000 mL de agua destilada], 0.1 mL de resarzurina a 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g de peptona de soya (Merck®), 0.1 g de extracto de levadura (SigmaAldrich®), 2 mL de solución cisteína-sulfido [2.5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich®) en 15 mL de 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g de Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O (Merck®) aforado en 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución a 8 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck®) y 52.6 mL de agua destilada. El medio se esterilizó 15 min en autoclave a 121 °C y 15 psi (Torres-Salado *et al.*, 2019).

**Solución NaOH (2N):** En 1 L de agua destilada se disolvieron 80 g de NaOH. La solución se vertió en viales serológicos (60 mL) hasta llenarlos completamente para obtener los viales trampa de NaOH 2N.

**Solución salina saturada:** En 1 L de agua destilada se disolvieron 370 g de NaCl y se agregaron 5 mL anaranjado de metilo al 0.1 %. El pH se ajustó a 2. La solución se vertió en viales serológicos (120 mL) hasta llenarlos completamente para obtener los viales trampa de solución salina saturada.

**Biodigestores:** En viales serológicos de vidrio (120 mL) se agregaron 0.5 g de un tipo de dieta y 45 mL de medio de cultivo. Los viales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas con CO<sub>2</sub>, se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm Ø) y con un arillo de aluminio. Los biodigestores se esterilizaron 15 minutos a 121 °C y 15 psi, y se incubaron 24 h a 39 °C para verificar esterilidad (Herrera-Pérez *et al.*, 2018). Los biodigestores se inocularon con 5 mL de fluido ruminal; el cual se obtuvo de una Suiz-bu provista de cánula ruminal que pastoreó en praderas con pasto pangola y se filtró con una manta de cielo para eliminar las macropartículas de materia orgánica. Esta se manejó de acuerdo al reglamento interno de bioética y bienestar de la UAGro con fundamento en las normas oficiales (NOM-062-ZOO-1999).



Producción de biogás: Una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos se usaron para acoplar el biodigestor con un vial trampa de solución salina saturada. El vial trampa se colocó de manera inversa en una probeta modificada que sirvió para coleccionar la solución salina desplazada por los gases que se producen durante la incubación mediante una aguja hipodérmica colocada como válvula de salida. La producción de gas se midió a las 24, 48 y 72 h.

Producción de gas metano (CH<sub>4</sub>): La producción de CH<sub>4</sub> se midió a las 24, 48 y 72 horas con el mismo procedimiento que gas total; pero, se usó el vial trampa de solución NaOH (2N). La producción de CH<sub>4</sub> se tomó como los mL desplazados de la solución NaOH (2N), ya que el CO<sub>2</sub> reacciona con el NaOH formando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Torres-Salado *et al.*, 2019).

Degradaciones: El contenido del biodigestor se filtró en bolsas ANKOM® a peso constante y se secaron a 60 °C por 24 h en una estufa. La capacidad de degradación de la materia seca (DMS) se calculó con la fórmula:  $DMS (\%) = (g \text{ muestra inicial} - g \text{ muestra final} / g \text{ muestra inicial}) * 100$ . Las bolsas ANKOM® se sellaron a calor y se determinó el contenido de FDN (Van Soest *et al.*, 1991). El porcentaje de degradación de la FDN (% DFDN) se calculó con la fórmula  $DFDN (\%) = (FDN \text{ inicial} - FDN \text{ no degradado} / FDN \text{ inicial}) * 100$  (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

Los resultados de biogás, metano y degradaciones de las dietas (5 repeticiones independientes por dieta) se analizaron mediante un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS® (2011) y las diferencias de medias se analizaron usando la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

**Cuadro 1.** Composición de las dietas para becerros en crecimiento con la inclusión creciente de hasta 30 % de vaina de *Moringa oleifera*.

Ingredientes	Dieta			
	D1	D2	D3	D4
Maíz molido (%)	50	49	46	41
Heno de pasto pangola (%)	28	21	15	12
Melaza (%)	5	5	5	5
Pasta Soya (%)	13	11	10	8
Vaina <i>Moringa oleifera</i> (%)	-	10	20	30
Mezcla mineral (%)	3	3	3	3
Urea	1	1	1	1
Composición bromatológica				
Materia seca (%)	92.32	92.30	92.80	92.93
Cenizas (%)	5.70	6.12	6.18	6.81
Materia orgánica (%)	94.30	93.88	93.82	93.19
Fibra detergente neutro (%)	31.99	39.13	32.24	34.38
Fibra detergente ácido (%)	14.85	23.56	16.22	18.97
Proteína cruda (%)	18.62	17.86	19.14	18.27

D1 = 0% vaina de *M. oleifera*; D2 = 10% de *M. oleifera*; D3 = 20% de *M. oleifera* y D4 = 30% de *M. oleifera*.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inclusión de hasta 20 % de vaina (D2 y D3) propicio 20.9 % mayor producción de biogás a las 24 h, con respecto a la dieta testigo (D1;  $p \leq 0.05$ ). En contraste, a las 48 h D1 produjo 11.26 % más biogás que D2. A las 72 h, la producción parcial de biogás no presentó diferencias ( $p > 0.05$ ) entre dietas que incluyeron vaina *M. oleifera* (D2, D3 y D4). Las dietas que incluyeron hasta 20 % de vaina (D2 y D3) mostraron mayor producción de biogás acumulado. De modo que, D2 mostró 13.01 % mayor producción de biogás que D1, indicando una mayor cantidad de carbohidratos fermentables en la dieta que contiene 10 % de vaina (D2, Cuadro 2). La producción de biogás durante los tiempos de fermentación evaluados en las dietas se puede asumir al contenido de taninos que contiene la vaina de *M. oleifera*, ya que el biogás disminuyó a medida que se aumentó el contenido de vaina de *M. oleifera* en la dieta (Velázquez, 2011) y a las diferencias en la disponibilidad de los nutrientes disponibles en la dieta, eficiencia del uso del sustrato por los microorganismos, origen y densidad de los microorganismos presentes (Herrera-Pérez *et al.*, 2018).

Las dietas que incluyeron hasta 20 % de vaina de *M. oleifera* (D1, D2 y D3) no presentaron diferencias en la producción parcial de CH<sub>4</sub> a las 24 h ( $p > 0.05$ ). A las 48 h, la producción de CH<sub>4</sub> aumentó en D2 (10 % de vaina *M. oleifera*) y D4 (30 % de vaina *M. oleifera*) 53 % con respecto a D1 (dieta testigo). A las 72 h, D2 y D4 mostraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ), pero cada una no fue diferente al resto de las dietas ( $p > 0.05$ ). La producción acumulada de metano no presentó diferencias entre la dieta testigo (D1) y aquellas que incluyeron hasta 20 % de vaina de *M. oleifera* ( $p > 0.05$ ). Los valores de CH<sub>4</sub> se pueden asumir a la fermentación de los carbohidratos estructurales de la dieta, ya que los productos de su fermentación es acetato e hidrógeno; este último propicia una relación sintrópica entre microorganismos porque los metanógenos usan hidrógeno y dióxido de carbono como sustrato para producir CH<sub>4</sub> como ruta metabólica para producción de energía (Torres-Salado *et al.*, 2019).

La degradación de la materia seca (DMS) en las dietas que contenían vaina de *M. oleifera* mostró que D2 y D3 fueron 4.2 % mayor a D4 ( $p \leq 0.05$ ), pero al compararlas con la dieta testigo (D1), la DMS disminuyó en promedio 9.5 % ( $p \leq 0.05$ ). En el caso de la degradación de la fibra detergente neutro (DFDN) se observó que conforme aumentó la inclusión de vaina de *M. oleifera* disminuyó la DFDN ( $p \leq 0.05$ ), ya que la dieta testigo (D1) degradó 52.36 % más FDN que D4 ( $p \leq 0.05$ ). La degradación de la FDN permite predecir el aporte de nutrientes, estimar contenido de energía y es indicativo del consumo de materia seca (Hoffman *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque en el presente estudio, las dietas que incluyeron vaina de *M. oleifera* (D2, D3 y D4) presentaron menor DFDN que la testigo, según Hoffman *et al.* (2007) no indican una afectación en el contenido de energía ni en el consumo potencial de la MS, ya que los valores tendrían que ser menores a 40 %.



**Cuadro 2.** Producción de biogás, metano y degradaciones *in vitro* de dietas para becerros en crecimiento que contienen hasta 30 % de vaina de *Moringa oleifera*.

Variables		D1	D2	D3	D4	EEM
Producción biogás (mL g <sup>-1</sup> )	24*	120.08 <sup>b</sup>	146.51 <sup>a</sup>	143.95 <sup>a</sup>	137.36 <sup>ab</sup>	2.89
	48*	27.17 <sup>a</sup>	24.42 <sup>ab</sup>	18.41 <sup>bc</sup>	16.50 <sup>c</sup>	1.19
	72*	13.37 <sup>a</sup>	10.59 <sup>ab</sup>	8.14 <sup>b</sup>	9.21 <sup>b</sup>	0.49
	Acumulada	160.62 <sup>b</sup>	181.52 <sup>a</sup>	170.50 <sup>ab</sup>	163.07 <sup>b</sup>	2.38
Producción metano (mL g <sup>-1</sup> )	24*	43.16 <sup>a</sup>	38.21 <sup>ab</sup>	40.51 <sup>a</sup>	33.55 <sup>b</sup>	0.90
	48*	5.83 <sup>c</sup>	9.50 <sup>a</sup>	6.43 <sup>bc</sup>	8.34 <sup>ab</sup>	0.36
	72*	6.47 <sup>ab</sup>	7.02 <sup>a</sup>	6.11 <sup>ab</sup>	5.99 <sup>b</sup>	0.14
	Acumulado	55.45 <sup>a</sup>	54.73 <sup>a</sup>	53.05 <sup>a</sup>	47.87 <sup>b</sup>	0.80
DMS		81.56 <sup>a</sup>	75.29 <sup>b</sup>	73.64 <sup>b</sup>	71.40 <sup>c</sup>	0.66
DFDN		64.74 <sup>a</sup>	59.01 <sup>b</sup>	47.57 <sup>c</sup>	42.49 <sup>d</sup>	1.50

<sup>abcd</sup> Medias con diferente literal en la misma fila indican diferencias ( $p \leq 0.05$ ). D1 = dieta testigo, D2 = inclusión 10 % vaina *Moringa oleifera*, D3 = inclusión 20 % vaina *Moringa oleifera*, D4 = inclusión 30 % vaina *Moringa oleifera*, EEM = error estándar de la media, DMS = Degradación de la materia seca a 72 h de incubación, DFDN = degradación de la fibra detergente neutro a 72 h de incubación, \*producción parcial.

## CONCLUSIONES

El estudio preliminar en laboratorio del uso de vaina de *Moringa oleifera* en dietas para becerros en crecimiento no es aconsejable, ya que se reduce la degradación de la materia seca y de la fibra detergente neutro, variables relacionadas directamente con la digestibilidad de un alimento *in vivo*.

## AGRADECIMIENTOS

Al cuerpo académico UAGRO-CA-183 “Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico”.

## LITERATURA CITADA

- Galindo, J., D. Delgado, R. Pedraza y D. García. 2005. Impacto de los árboles, los arbustos y otras leguminosas en la ecología ruminal de animales que consumen dietas fibrosas. *Pastos y Forrajes*. 28:59-68.
- Hernández-Morales, J., P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, J. Herrera-Pérez, R. A. Rojas-García, I. Reyes-Vázquez y M. A. Mendoza-Núñez. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 9(01): 105-120.
- Herrera-Pérez, J., L. Vélez-Regino, P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, R. A. Rojas-García y M. Maldonado-Peralta. 2018. Fermentación *In*: Casanova, L. F., Cetzal, I. W., Díaz, E. V. F., Chay, C. A. J., Oros, O. I., Piñeiro V. A. T., González, V. N. A. 2018. *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae): árbol exótico con gran potencial para la ganadería ecológica en el trópico. *Agroproductividad* 11(2): 100-105.
- Hoffman, P. C., K. M. Lundberg, L. M. Bauman, R. D. Shaver y F. E. Contreas-Govea. 2007. Digestibilidad *in vitro* del FDN (fibra detergente neutro): el debate de 30 vs 48 h. *Universidad de Wisconsin. Focus Forage*. 5: 1-4.



- Kumar, S., P. K. Choudhury, M. D. Carro, G. W. Griffith, S. S. Dagar and M. Puniya. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 31-44.
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. SENASICA, México. 22 de agosto de 2001. URL disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999>.
- NRC. 2000. Nutrient Requirements of Small Ruminants. Animal Nutrition Series. The National Academies Press. Washington, D.C. 362 p.
- Quintanilla, M. J., C. S. Joaquín, G. J. Martínez, M. A. Limas, A. D. López, B. Estrada y M. J. Hernández. 2018. Usos de *Moringa oleifera* Lam. (moringaceae) en la alimentación de rumiantes. *Agroproductividad* 11(2):89-93.
- Ramírez-Mella, M. M. M. 2018. Técnica de producción de gas *in vitro* para estimar la producción de metano. *Agroproductividad* 11(2): 64-69.
- Rodríguez, R., N. González, J. Alonso, M. Domínguez y L. Sarduy. 2014. Valor nutritivo de harinas de follaje de cuatro especies arbóreas tropicales para rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48(4): 371-378.
- Sánchez-Santillán, P., M. G. Torres- Cardona, R. G. Campos- Montiel, R. Soriano-Robles, F. Fernández-Luqueño, G. Medina- Pérez, O. E. Del Razo- Rodríguez y I. Almaraz- Buendía. 2018. Potencial de emisión de gases efecto invernadero de plantas forrajeras por fermentación entérica. *Agroproductividad* 11(2): 40-45.
- SAS. 2011. SAS/STAT Software. Versión 9.3. Cary, NC SAS, USA: Institute INC.
- Torres-Salado, N., P. Sánchez-Santillán, R. A. Rojas-García, I. Almaraz-Buendía, J. Herrera-Pérez, I. Reyes-Vázquez y F. J. Mayren-Mendoza. 2019. Producción de gas *in vitro* y características fermentativas de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfala de agua (*Bubalus bubalis*) y vaca suiz-bu. *Agrociencia* 53(2): 145-159.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10): 3583-3597.
- Velázquez, A. J., M. González-Ronquillo, J. Bórquez, I. A. Domínguez y R. Perezgrovas. 2011. Composición química y producción de gas *in vitro* de dietas con vainas de *acacia farnesiana*. *Archivos de Zootecnia* 60(231): 637-645.