

Características químicas y fermentativas *in vitro* de dietas para becerros con inclusiones crecientes de vaina y hojas de *Moringa oleifera*

In vitro fermentative characteristics and chemical quality of calf diets with increased inclusions of *Moringa oleifera* pods and leaves

 Paulino Sánchez-Santillán¹  Conchita Rivera-Cristobal²  Nicolás Torres-Salado¹
 Isaac Almaraz-Buendía¹  Jerónimo Herrera-Pérez^{2*}

¹ Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, México.

² Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

*Autor de correspondencia: Jerónimo Herrera-Pérez, Universidad Autónoma de Guerrero, Km 197, Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, Cuajinicuilapa, Guerrero. mvzjro@hotmail.com

Recibido: 26 de agosto del 2021
Aprobado: 22 de septiembre del 2022
Publicado: 07 de diciembre del 2022

Editor temático: Claudia Janeth Ariza Nieto, (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]), Bogotá, Colombia.

Para citar este artículo: Sánchez-Santillán, P., Rivera-Cristobal, C., Torres-Salado, N., Almaraz-Buendía, I., & Herrera-Pérez, J. (2022). Características químicas y fermentativas *in vitro* de dietas para becerros con inclusiones crecientes de vaina y hojas de *Moringa oleifera*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(3), e2685. DOI https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num3_art:2685

Resumen: Las hojas y las vainas de las leguminosas son una alternativa de alimentación de rumiantes en el trópico. El objetivo del presente estudio fue determinar las características químicas y fermentativas *in vitro* de vaina y hoja de *Moringa oleifera*, con inclusiones de 0 %, 10 %, 20 % y 30 % en una dieta integral para becerros de 200 kg de peso vivo. A las hojas, las vainas y las dietas se les determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente (FDN), producción acumulada de gas y metano, degradación de MS (DMD) y FDN (DFDN). El análisis de las variables fue mediante un diseño completamente al azar (10 repeticiones) y la hoja cuantificó 229,4, 465,8 y 204,0 g/kg MS de MS, FDN y PC, respectivamente. Así como, 662,3 y 688,9 g/kg de MS de DMS y DFDN ($P < 0,05$). La dieta con 10 % de hoja de *M. oleifera* presentó 824,9 y 725,5 g/kg de MS de DMD y DFDN, así como 167 y 58 ml/g MS de gas y metano. En conclusión, la hoja de *M. oleifera* muestra mejores características químicas y fermentativas *in vitro* y se puede incluir hasta 30 % de hoja de *M. oleifera* en dietas integrales para becerros de 200 kg de peso vivo.

Palabras clave: ganado bovino, degradación, producción de gas, proteínas vegetales, trópico.

Abstract: Legume leaves and pods are an alternative feed for ruminants in the tropics. The goal of this study was to determine the chemical quality and *in vitro* fermentative characteristics of *Moringa oleifera* pods and leaves, with inclusions of 0 %, 10 %, 20 % and 30 % in a complete diet for calves of 200 kg live weight. Dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), cumulative gas and methane production, DM degradation (DMD) and NDF (NDFD) were determined from the leaves, pods and diets. The variables were analyzed using a completely randomized design (10 replicates). The leaf quantified 229.4, 465.8 and 204.0 g/kg DM, NDF and CP. As well as 662.3 and 688.9 g/kg DM of DMD and NDFD ($P < 0.05$). The diet with 10% *M. oleifera* leaf presented 824.9 and 725.5 g/kg DM of DMD and NDFD; as well as 167 and 58 ml/g DM of gas and methane. In conclusion, *M. oleifera* leaf shows better chemical and fermentative characteristics *in vitro* and up to 30% *M. oleifera* leaf can be included in whole-calf diets for calves of 200 kg live weight.

Keywords: cattle, degradation, gas production, plant protein, tropics.



Introducción

La alimentación de bovinos en el trópico está basada en el pastoreo, sin embargo, la producción de forraje está condicionada a la época del año (Carrera et al., 2014). En el trópico, las condiciones ambientales provocan un rápido crecimiento de pastos, propiciando una alta concentración de pared celular, una baja digestibilidad y la disponibilidad de energía (Sánchez-Santillán et al., 2021). Además, en la época de sequía, la calidad nutritiva y la disponibilidad de los forrajes es baja (Carrera et al., 2014), esto requiere de estrategias que permitan el desarrollo fisiológico de los becerros durante esta época, ya que el pastoreo se lleva a cabo con ciertas limitaciones nutricionales (Carrera et al., 2014). Una alternativa es la alimentación de becerros mediante una dieta integral, en la cual se puedan incorporar ingredientes de la región para reducir costos, pero sin que se vea afectada la calidad nutritiva.

En el trópico seco se tiene la posibilidad de usar productos regionales como vainas y hojas de leguminosas arbóreas y arbustivas como alternativas para la alimentación de rumiantes, no obstante, es preciso conocer las características fermentativas y su composición bromatológica para establecer ventajas y limitaciones de su uso (García et al., 2006). La *M. oleifera* es un árbol originario de determinadas regiones de Asia y África, con capacidad de adaptación a territorios de climas calurosos y pluviometrías escasas. Las diferentes estructuras de la planta (hoja, raíz, corteza, flores y vainas) se usan por sus capacidades como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano y antiséptico (Doménech et al., 2017). González (2013) reportó contenidos de 39,0 % de MS, 18,8 % de PC, 45,1 % de FDN, 24,1 % de carbohidratos solubles y 64,7 % de digestibilidad *in situ* de MS, de modo que *M. oleifera* es una alternativa para la alimentación de rumiantes en el trópico (Folkard & Sutherland, 1996; Meza et al., 2016), mediante su inclusión en dietas integrales o suplementación, porque se recolectan hojas y vainas en la época seca (Folkard & Sutherland, 1996). Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las características químicas y fermentativas *in vitro* de vaina y hoja de *M. oleifera*, con inclusiones de 0 %, 10 %, 20 % y 30 % en una dieta integral para becerros de 200 kg de peso vivo. La hipótesis fue que la inclusión de hoja o vaina de *M. oleifera* en dietas para becerros no modificará la composición química o las características fermentativas *in vitro* con respecto a una dieta testigo.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia #2 de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Geográficamente, se localiza entre los paralelos 16° 19' y 16° 36' de latitud norte y los meridianos 98° 21' y 98° 44' de longitud oeste.

El presente estudio consistió en dos ensayos: 1) A la hoja y la vaina de *M. oleifera* se les realizó un análisis químico y fueron evaluadas con la técnica de producción de gas *in vitro* y 2) se elaboraron dietas integrales para becerros de 200 kg de peso vivo que incluían 10 %, 20 % o 30% de hoja o vaina de *M. oleifera* para evaluar sus características fermentativas *in vitro*.

Muestras

De 10 árboles de moringa, se seleccionaron cuatro ramas al azar en cada árbol y se cosecharon todas las vainas fisiológicamente maduras y las hojas más jóvenes; las hojas y las vainas colectadas se depositaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de nutrición animal para su análisis (Hernández-Morales et al., 2018). La colecta se hizo en la primavera del 2018 en el municipio de Cuajinicuilapa, en Guerrero, México. Las muestras se deshidrataron a 60 °C hasta un peso constante en una estufa (Felisa® FE-293A) y se molieron con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®).

Dietas

Las dietas se elaboraron con ingredientes de la región (tabla 1) y se ajustaron con base en la tasa de crecimiento y la etapa fisiológica para bovinos de 200 kg de peso vivo (NRC, 1996). Las dietas se deshidrataron a 60 °C hasta un peso constante en una estufa y se molieron con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de dietas para becerros que incluyen cantidades crecientes de hoja o vaina de *M. oleifera*

Variables	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Ingredientes (g/kg materia húmeda)							
Grano de maíz	500	510	530	520	490	460	410
Heno de pangola	280	200	120	60	210	150	120
Melaza de caña	50	50	50	50	50	50	50
Pasta de soya	130	100	60	30	110	100	80
Hoja de <i>M. oleifera</i>	-	100	200	300	-	-	-
Vaina de <i>M. oleifera</i>	-	-	-	-	100	200	300
Mezcla mineral	30	30	30	30	30	30	30
Urea	10	10	10	10	10	10	10
Composición química (g/kg materia seca)							
Materia seca	923,2	919,7	921,4	932,4	923,0	928,0	929,3
Cenizas	57,0	60,7	63,6	69,3	61,2	61,8	68,1
Materia orgánica	943,0	939,3	936,4	930,7	938,8	938,2	931,9
Fibra de detergente neutro	319,9	340,8	214,2	238,2	391,3	322,4	343,8
Fibra de detergente ácido	148,5	177,8	74,7	94,9	235,6	162,2	189,7
Hemicelulosa	171,5	163,0	139,4	143,3	155,7	160,2	154,2
Proteína cruda	186,2	178,9	180,1	182,2	178,6	191,4	182,7

T0 = testigo; T1 = inclusión de 10 % de hoja de *M. oleifera*; T2 = inclusión de 20 % de hoja de *M. oleifera*; T3 = inclusión de 30 % de hoja de *M. oleifera*; T4 = inclusión de 10 % de vaina de *M. oleifera*; T5 = inclusión de 20 % de vaina de *M. oleifera*; T6 = inclusión de 30 % de vaina de *M. oleifera*.

Fuente: elaboración propia

Análisis químico

A hojas, vainas y dietas se les determinó el contenido de MS (método 930,15) en un crisol a peso constante, donde se agregaron 2 g de muestra y se deshidrataron por 72 h en una estufa a 55 °C. Por su parte, en un crisol a peso constante se agregaron 2 g de muestra y se incineraron en una mufla (Lindberg, 51848) a 600°C por 3 h para cenizas (Ce, método 942,05) y 0,3 g de muestra se sometieron a un proceso de digestión, destilación y titulación en un equipo micro Kjeldahl (Tecnal) (Association of Official Analytic Chemists [AOAC], 1990) para PC (método 920,105).

Además, a 0,5 g de muestra se les determinó FDN y FDA con la metodología Ankom[®] Technology Method según Van Soest et al. (1991) y lignina detergente ácida (LDA) con la metodología AOAC (1990) en un analizador de fibra (Labconco). La hemicelulosa se determinó por diferencia entre FDN y FDA y la materia orgánica se obtuvo a restarle 100 el contenido de cenizas.

Producción de gas *in vitro*

El medio de cultivo contenía 30 ml de fluido ruminal clarificado [líquido ruminal bovino fresco que fue centrifugado durante 10 min. a 12,857 g y esterilizado (All American[®] 1941X) durante 15 min a 121 °C y 15 psi], 5 ml de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (J. T. Baker[®]) en 1 l de agua destilada], 5 ml de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (J. T. Baker[®]) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (J. T. Baker[®]) + 12 g NaCl (Meyer[®]) + 2,45 g MgSO₄ (Meyer[®]) + 1,6 g CaCl-2H₂O (Meyer[®]) en 1 l de agua destilada], 0,1 ml de resazurina al 0,1% (Sigma-Aldrich[®]), 0,2 g de peptona de soya (MCD Lab[®]), 0,1 g de extracto de levadura (BD Bioxon[®]), 4 ml de solución cisteína-sulfido [2,5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich[®]) + 2,5 g de Na₂S-9H₂O (Meyer[®]) a pH 10 ajustado con NaOH (2N), [80 g de NaOH (Merck[®]) y aforado en 100 ml de agua destilada], 5 ml de solución al 8 % de Na₂CO₃ (J. T. Baker[®]) y 52,6 ml de agua destilada. El medio se esterilizó durante 15 min en autoclave a 121 °C y 15 psi (Sánchez-Santillán et al., 2020).

Los viales trampa para biogás se prepararon colocando una solución salina saturada [350 g de NaCl en 1 l de agua destilada y 5 ml de naranja de metilo (Meyer[®]) al 0,1 %] en viales serológicos de 120 ml. El pH de la solución salina saturada se ajustó a pH 2 con HCl (2N) y un potenciómetro (Hanna[®] HI2211; calibración pH 7 y 4). Los viales trampa para CH₄ se prepararon con solución de NaOH (2N) en 1 l de agua destilada] (Sánchez-Santillán et al., 2020).

Un vial serológico de vidrio (120 ml) con 0,5 g de muestra y 45 ml de medio de cultivo se consideró un biodigestor. Los viales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas con CO₂, se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm Ø) y con un arillo de aluminio. Los biodigestores se esterilizaron durante 15 min a 121 °C y 15 psi, y se incubaron por 24 h a 39 °C para verificar su esterilidad en una incubadora (Ecoshel[®] 9082). Los biodigestores se inocularon con 5 ml de fluido ruminal fresco (se filtró con tres capas de gasa y se centrifugó a 1,257 x g por 3 min) y se incubaron a 39 °C por 72 h. La vaca Suiz-Bú canulada se manejó de acuerdo con el reglamento interno de bioética y bienestar de la UAGro con fundamento en la norma oficial (NOM-062-ZOO-1999). La vaca pastó en praderas sin fertilizar de pasto pangola (*Digitaria decumbes*) con una edad de rebrote de 56 d antes de recolectar el fluido ruminal (Texta et al., 2019).

Los biodigestores se conectaron al vial trampa mediante una manguera de Taygon® (2,38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos. En el vial trampa se colocó una aguja (20 G x 32 mm) de manera oblicua como válvula de escape y se colocó invertido sobre una probeta modificada de 50 ml. La producción de biogás o CH₄ se cuantificó como desplazamiento de la solución a 24, 48 y 72 h de incubación (Sánchez-Santillán et al., 2020).

Características fermentativas

El pH de los medios de cultivo se determinó a las 72 h de incubación y para el conteo de bacterias totales se usó una micropipeta (Corning®) para extraer 1 ml del medio contenido en el biodigestor con 72 h de incubación en un tubo de ensayo (Pirex®), con 0,25 ml de formaldehído al 10 % (Sigma-Aldrich®). La cantidad de bacterias totales se calculó realizando el conteo directo en una cámara Petroff Houser y para el recuento se usó un microscopio óptico (BX31, Olympus) a una magnificación de 1000x (Sánchez-Santillán et al., 2016).

La concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) se determinó al mezclar 1 ml del medio contenido en el biodigestor con 72 h de incubación con 0,25 ml de ácido metafosfórico al 25 % (Meyer®; proporción 4:1) y se centrifugó a 3500x g por 25 min. El sobrenadante se recuperó en viales de 2 ml; 20 µl de este sobrenadante fueron mezclados con 1 ml de solución fenol [10 mg de Na₂(NO)Fe(CN)₅.H₂O (Meyer®) + 10 g de cristales de fenol (Meyer®) aforado en 1 l de agua destilada] y 1 ml de solución hipoclorito [7,5 g de NaOH (Reasol®) + 21,3 g de Na₂HPO₄ (Meyer®) + 15 ml de hipoclorito (5 %; Reasol®) aforado en 1000 ml de agua destilada]. Las muestras se mantuvieron a 37 °C por 30 min en baño maría (Shel Lab® 1227), se adicionaron 5 ml de agua destilada para diluir las muestras, se agitaron con un vórtex (Genie 2 G-560) y se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway® 6850) calibrado con un método ($r^2 = 0,9994$) de concentración de nitrógeno amoniacal (McCullough, 1967).

La muestra residual se filtró en bolsas Ankom® a peso constante y las bolsas con muestra se secaron por 24 h a 60 °C en una estufa. La DMS se calculó con la fórmula descrita por Hernández-Morales et al. (2018) y Sánchez-Santillán et al. (2015). Las bolsas Ankom® se sellaron con 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 según Almaraz-Buendía et al. (2019) y Torres-Salado et al. (2019). La energía metabolizable de las dietas experimentales se estimó a partir de la ecuación reportada por Sandoval et al. (2016), EM (Mcal kg⁻¹MS) = (2,20 + 0,136GP + 0,057PC) × 0,238846; donde: GP = gas producido por 0,2 g de sustrato en 24 h y PC= contenido de proteína cruda de la muestra.

Análisis estadístico

Las variables de análisis químico y de producción de gas *in vitro* de las hojas y vainas, así como las variables de producción de gas *in vitro* de las dietas con inclusión de hasta 30 % de hoja o vaina de *M. oleifera*, se analizaron en un diseño completamente al azar. El procedimiento fue GLM (*Generalized Linear Models*) de SAS (2003) y los promedios se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados y discusión

Caracterización de la hoja y vaina de *M. oleifera*

El contenido de MS, FDN, FDA, LDA y MO de la hoja representó 24,8 %, 72,9 %, 54,5 %, 57,2 % y 98,2 % ($P < 0,05$) del contenido de la vaina, respectivamente. Además, el contenido de Ce, PC y hemicelulosa de la vaina fue de 86,2 %, 55,5 % y 71,1 % ($P < 0,05$) respecto al contenido de la hoja (tabla 2). La diferencia entre las hojas y las vainas fue el estado de madurez fisiológico al momento de la recolección, ya que la composición de la pared celular cambia con el proceso de lignificación durante la madurez fisiológica (Hoffman et al., 2007). El contenido en la hoja de PC y MO es similar, mientras FDN y Ce fueron inferiores a lo reportado por Casanova-Lugo et al. (2018) en hoja de *M. oleifera* (tabla 2). Asimismo, Quintanilla-Medina et al. (2018) publicaron valores similares en PC y MO, y menores en Ce, FDN, FDA y hemicelulosa (tabla 2) en hojas de *M. oleifera*. Además, Díaz-Fuentes et al. (2019) publicaron valores similares de MS en hojas (tabla 2). Melesse et al. (2017) mencionaron que la vaina contiene 10,5 %, 17,4 %, 45,2 %, 46,5 % de Ce, PC, FDN, FDA, respectivamente, valores similares en Ce, mayores en PC e inferiores en FDN y FDA al presente estudio. Las diferencias en el contenido de las hojas o las vainas de *M. oleifera* se pueden asumir respecto a las condiciones climáticas al momento de la colecta, sitio dentro del árbol de la colecta y época de año de la colecta.

Tabla 2. Composición química y características fermentativas *in vitro* de la hoja y la vaina de *M. oleifera*

Variable	Hoja	Vaina	SE	p-valor*
Materia seca (g/kg MS)	229,4	923,5	7,96	< 0,0001
Cenizas (g/kg MS)	113,9	98,2	0,20	< 0,0001
Proteína cruda (g/kg MS)	204,0	133,2	0,86	< 0,0001
Fibra de detergente neutro (g/kg MS)	465,8	638,6	2,06	< 0,0001
Fibra detergente ácido (g/kg MS)	273,2	501,6	2,69	< 0,0001
Lignina de detergente ácido (g/kg MS)	62,1	108,5	0,98	0,0131
Materia orgánica (g/kg MS)	886,1	901,8	2,58	< 0,0001
Hemicelulosa (g/kg MS)	192,7	137,0	0,92	0,0007
Degradación de materia seca (g/kg MS)	662,3	482,9	1,76	< 0,0001
Degradación de FDN (g/kg FDN)	688,9	440,0	2,71	< 0,0001
pH	6,69	6,75	0,01	< 0,0001
Nitrógeno amoniacal (mg/dl)	27,62	25,39	0,45	0,0096
Conteo total de bacterias (10^8 células/ml)	7,96	5,80	0,35	0,0005
Energía metabolizable (Mcal/kg MS)	1,66	1,40	0,03	< 0,0001

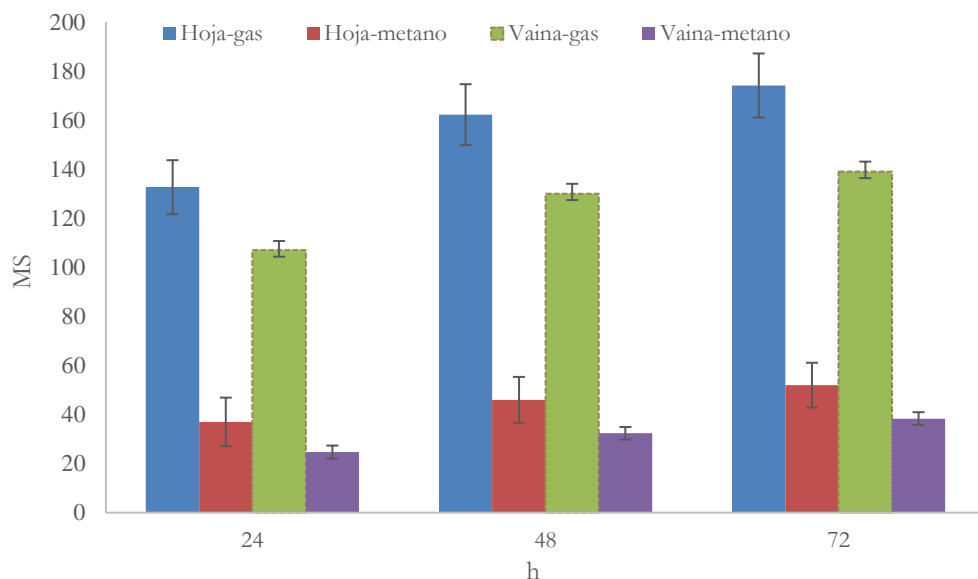
*p-valor de la comparación de medias

MS = materia seca, FDN = fibra de detergente neutro, SE = error estándar de la media

Fuente: elaboración propia.

La producción de gas *in vitro* mostró que la hoja produjo 24 %, 30 %, 24 %, 62 % y 25,18 % más ($P < 0,05$) gas que la vaina a las 24, 48 y 72 h de fermentación, respectivamente (figura 1). La producción de gas (CO_2 y CH_4) es producto de la fermentación de los carbohidratos, de modo que según Texta et al. (2019) y Torres-Salado et al. (2019) en las primeras 24 h se fermentan los carbohidratos no estructurales y a partir de las 24 h se fermentan los carbohidratos estructurales. Valores mayores de gas se reportaron en hojas de *Gnuzuma ulmifolia* y *Leucaena leucocephala* (Torres-Salado et al., 2018); así como una menor producción de gas al presente estudio en vainas de *Samanea saman* Jacq. y *Enterolobium cyclocarpum* (Torres-Salado et al., 2018).

La hoja produjo 48,00 %, 43,75 % y 36,84 % más de ($P < 0,05$) CH_4 que la vaina de *M. oleifera* a las 24, 48 y 72 h de fermentación, respectivamente (figura 1). Las diferencias en la producción de CH_4 se asumen por las composiciones químicas de la hoja y la vaina (Khang et al., 2019) y los productos de su fermentación (acetato, propionato, butirato, CO_2 e H_2) (Vanegas et al., 2017; Gang et al., 2020), ya que el CO_2 y el H_2 son usados por las arqueas metanógenas como estrategia metabólica y producen CH_4 como producto final de su ruta metabólica (Torres-Salado et al., 2019).



*Las barras corresponden al error estándar de la media

Figura 1. Volumen máximo de gas y metano (ml/g MS) por la fermentación *in vitro* de hoja y vaina de *M. oleifera*

Fuente: elaboración propia

La hoja presentó un 37,15 % y un 56,57 % más ($P < 0,05$) de DMS y DFDN que la vaina de *M. oleifera* (tabla 2) porque contiene un mayor contenido celular y la composición de su pared celular tiene carbohidratos estructurales no lignificados (Ojo et al., 2017). Además, al recolectarse la vaina fisiológicamente madura, la composición de su pared celular fue celulosa y hemicelulosa mezclada con lignina, lo que aumentó la fracción indigestible de la vaina (Luna et al., 2015). La DMS y la DFDN de la hoja de *M. oleifera* (tabla 2) fue mayor a la reportado por Hernández-Morales

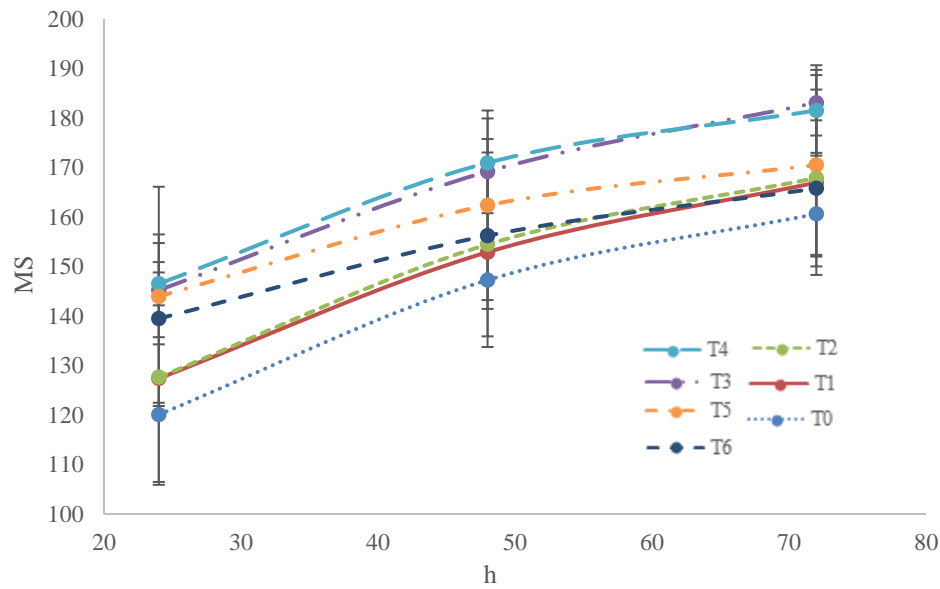
et al. (2018) en hojas de *Guaazuma ulmifolia* y *Leucaena leucocephala*, además, la DMS de la vaina de *M. oleifera* (tabla 2) fue menor y la DFDN (tabla 2) fue mayor que las vainas de *S. saman* y *E. cyclocarpum* (Hernández-Morales et al., 2018).

El pH del medio del cultivo después de 72 h de fermentación mostró que la vaina fue 0,89 % mayor ($P < 0,05$) que la hoja (tabla 2), mientras que el conteo total de bacterias de la hoja fue 37,24 % mayor ($P < 0,05$) que en la vaina (tabla 2). El conteo total de bacterias se debe a que la hoja posee una mayor disponibilidad de carbohidratos para la fermentación, los mismos que permiten un mayor crecimiento microbiano, lo que produce una mayor cantidad de ácidos como productos de fermentación y que disminuyen el pH del medio del cultivo. La diferencia en la concentración de N-NH₃ es por el contenido y la degradabilidad de PC de la hoja o la vaina de *M. oleifera* (tabla 2), ya que el N-NH₃ es el resultado de la degradación de compuestos nitrogenados (Du et al., 2019). El conteo total de bacterias (tabla 2) es inferior a lo publicado por Hernández-Morales et al. (2018) en dos tipos de hoja y cinco vainas de leguminosas arbóreas, incluyendo a *M. oleifera* (Moringaceae), por lo que la interpretación y la discusión de este apartado da como resultado que la hoja de *M. oleifera* presente un 18,57 % más de ($P < 0,05$) EM que la vaina de *M. oleifera*.

Caracterización de dietas que incluyen hasta 30 % de hoja o vaina de *M. oleifera*

La producción de gas no mostró diferencias ($P > 0,05$) entre dietas que contenían hoja (T1, T2 y T3) o vaina de *M. oleifera* (T4, T5 y T6). Asimismo, la dieta con 30 % de hoja (T3) y 10 % de vaina (T4) produjo más gas ($P < 0,05$) que la dieta testigo (T1) (figuras 2 y 3), lo que indica que las dietas que contienen 30 % de hoja (T3) o 10 % de vaina (T4) tienen una mayor disponibilidad de carbohidratos para la fermentación ruminal que la dieta testigo. Soltan et al. (2018) reportaron que la adición de hasta 50 g/kg de corteza de raíz de *M. oleifera* en una dieta integral para corderos no afecta la producción de gas, discusión similar a la del presente estudio, ya que T0, T1, T2, T5 y T6 no presentaron diferencias ($P > 0,05$) en la producción de gas (figura 2). Valores superiores de gas al presente estudio fueron reportados en una dieta integral que contenía 10 % de hoja de *M. oleifera* (Elghandour et al., 2017).

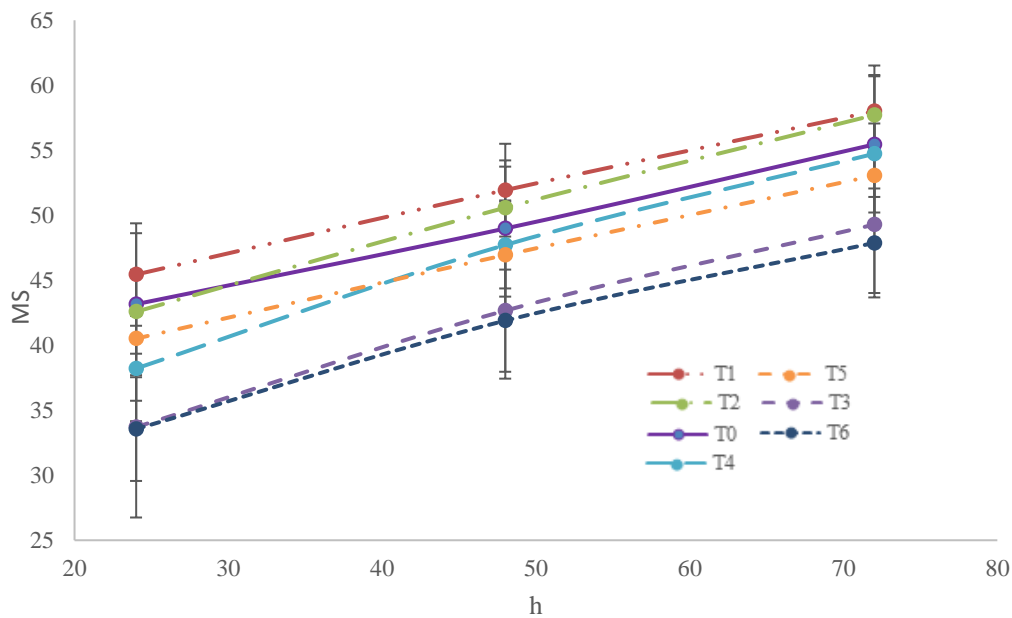
Aquellas dietas que contenían una mayor proporción de hoja (T3) o vaina (T6) de *M. oleifera* mostraron una menor producción ($P < 0,05$) de CH₄ que la dieta testigo (T0) (figura 3). En otras palabras, en la dieta testigo la producción de CH₄ representa el 34,52 % del total de gas, ocho puntos porcentuales más que la dieta con 30 % de hoja (T3) y seis puntos porcentuales más que la dieta con 30 % de vaina (T6) (tabla 2). Esto se puede asumir debido al contenido de metabolitos secundarios de *M. oleifera* que mitigan la emisión de CH₄, porque favorecen la síntesis de propionato, afectan la metanogénesis por competencia reducida del hidrógeno, mejoran la eficiencia energética y son tóxicos para los protozoarios ciliados (Sánchez-Santillán et al., 2018; Ku-Vera et al., 2020). Por otra parte, valores inferiores se reportaron en una dieta integral que contenía 50 mg/kg de corteza de *M. oleifera* (Soltan et al., 2018), así como superiores en una dieta integral con 10 % de hoja de *M. oleifera* (Elghandour et al., 2017).



*Las barras corresponden al error estándar de la media

Figura 2. Volumen máximo de gas (ml/g MS) a las 72 h por la fermentación *in vitro* de dietas que contienen hasta 30 % de hoja o vaina de *M. oleifera*

Fuente: elaboración propia



*Las barras corresponden al error estándar de la media

Figura 3. Volumen máximo de metano (ml/g MS) a 72 h por la fermentación *in vitro* de dietas que contienen hasta 30 % de hoja o vaina de *M. oleifera*.

Fuente: elaboración propia

La DMS no mostró diferencias ($P > 0,05$) entre las dietas que contienen hoja (T1, T2 y T3) o vaina (T4, T5, T6) y el testigo (T0), sin embargo, la dietas con vaina presentaron un menor DMS ($P < 0,05$) que la dieta que contenía 30 % hoja de *M. oleifera* (tabla 3). La dieta con 10 % de hoja de *M. oleifera* mostró mejor DFDN; en contraste, la dieta con 30 % de vaina tuvo la menor DFDN ($P < 0,05$) (tabla 3). Los niveles de degradación se asumen al contenido de FDN, ya que la vaina contiene 37 % más que la hoja, lo que interfiere en los niveles de degradación por su composición química (Hoffman et al., 2007). Así, los valores inferiores de DMS fueron reportados por Elghandour et al. (2017) en dietas con 10 % de hoja de *M. oleifera*.

El medio de cultivo después de la fermentación mostró que el pH de las dietas que incluían hoja (T1, T2 y T3) no presentaron diferencias ($P > 0,05$) con el testigo (T0), mientras que las dietas que incluyeron vaina (T4, T5 y T6) presentaron el mayor valor de pH (tabla 3), esto se debe a los ácidos grasos producidos durante la degradación de la MS, ya que a mayor DMS, mayor es la producción de ácidos grasos, los cuales disminuyen el valor de pH (Sánchez-Santillán & Cobos-Peralta, 2016). Por su parte, la concentración de N-NH₃ no mostró diferencias entre dietas (tabla 3) ($p > 0,05$), indicando que las fracciones nitrogenadas de las dietas no fueron diferentes (Texta et al., 2019) porque en el presente estudio se realizaron las dietas isoproteicas, además, los niveles se encuentran dentro del rango para que las bacterias alcancen la máxima tasa de digestibilidad de la MS (Mehrez et al., 1977) y estos valores se reflejaron en el conteo de bacterias, ya que se reportaron 10⁹ células/ml (tabla 3), valores superiores a los recuentos reportados en condiciones *in vitro* (Hernández-Morales et al., 2018; Sánchez-Santillán et al., 2016). Los valores de EM entre dietas no mostraron diferencias ($P > 0,05$), promediando 1,66 Mcal/kg MS (tabla 3), lo que aporta el 83 % de lo demandado por los becerros de 200 kg de peso vivo (NRC, 1996).

Tabla 3. Características fermentativas *in vitro* de dietas que incluyen hasta 30 % de hoja o vaina de *M. oleifera*

Tratamiento	DMS (g/kg MS)	DFDN (g/kg MS)	pH	Bacteria (10 ⁹ células/ml)	N-NH ₃ (mg/dl)	EM (Mcal/kg)
T0	815,6 ^{ab}	647,4 ^{bc}	6,39 ^d	2,60 ^c	32,59	1,56
T1	824,9 ^{ab}	725,5 ^a	6,41 ^d	2,66 ^c	29,97	1,60
T2	824,5 ^{ab}	610,1 ^{cd}	6,40 ^d	3,28 ^b	29,75	1,60
T3	924,4 ^a	664,7 ^b	6,43 ^{cd}	3,75 ^a	30,41	1,72
T4	752,9 ^b	590,1 ^d	6,48 ^{bc}	3,72 ^a	32,00	1,72
T5	736,4 ^b	475,7 ^e	6,50 ^{ab}	3,84 ^a	32,55	1,72
T6	714,0 ^b	424,9 ^f	6,53 ^a	3,71 ^a	32,59	1,68
SE	1,62	1,27	0,01	0,07	0,30	0,01

^{a,b,c,d} Medias en la misma columna sin una letra común son diferentes a $P < 0,05$.

T0 = testigo; T1 = inclusión de 10 % de hoja de *M. oleifera*; T2 = inclusión de 20 % de hoja de *M. oleifera*; T3 = inclusión de 30 % de hoja de *M. oleifera*; T4 = inclusión de 10 % de vaina de *M. oleifera*; T5 = inclusión de 20 % de vaina de *M. oleifera*; T6 = inclusión de 30 % de vaina de *M. oleifera*; DMS = degradación de la materia seca; DFDN = degradación de la fibra de detergente neutro; pH = potencial de hidrógeno; bacteria = conteo total de bacterias; N-NH₃ = nitrógeno amoniacal; EM = energía metabolizable y SE = error estándar de la media.

Fuente: elaboración propia

Conclusiones

La hoja de *M. oleifera* contiene una mayor cantidad de carbohidratos fermentables que la vaina de *M. oleifera* con base en el ensayo *in vitro*. Además, la inclusión de hasta 30 % de su hoja o 10 % de su vaina en una dieta integral para becerros no reducen las características fermentativas *in vitro*, esto comparado con una dieta testigo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al “Cuerpo Académico UAGro-CA-183 Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico” por la financiación del estudio.

Contribución de los autores

Paulino Sánchez-Santillán: supervisión de la realización del experimento y redacción del artículo; Conchita Rivera-Cristobal: realización de la parte experimental; Nicolás Torre-Salado: análisis estadísticos y redacción del artículo; Issac Almaraz-Buendía: apoyo en la redacción e interpretación de los resultados; Jerónimo Herrera-Pérez: redacción del artículo y desarrollo metodológico de la investigación.

Implicaciones éticas

No existen implicaciones éticas.

Conflicto de interés

Los autores manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Financiación

Cuerpo Académico Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico “UAGro-CA-183”.

Referencias

Almaraz-Buendía, I., García, A. M., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Bottini-Luzardo, M. B., & Rojas-García, A. R. (2019). Análisis bromatológico y

- producción de gas *in vitro* de forrajes utilizados en el trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 260-266. <https://doi.org/10.21071/az.v68i262.4145>
- Association of Official Analytic Chemists [AOAC]. (1990). *Official Methods of Analysis* (15th ed). Washington DC, Estados Unidos: Association of Official Analytic Chemist.
- Carrera, C. B., Gómez, C. M., & Schwentesius, R. R. (2014). *La ganadería bovina de carne en México: un recuento necesario después de la apertura comercial*. Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
<https://elibros.uacj.mx/omp/index.php/publicaciones/catalog/book/9>
- Casanova-Lugo, F., Cetzal-Ix, W., Díaz-Echeverría, V. F., Chay-Canul, A. J., Oros-Ortega, I., Piñeiro-Vázquez, A. T., & González-Valdivia, N. A. (2018). *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae): árbol exótico con gran potencial para la ganadería ecológica en el trópico. *Agroproductividad*, 11(2), 100-105.
- Díaz-Fuentes, V. H., Ruíz-Cruz, P. A., Gálvez-Marroquín, L. A., Martínez-Valencia, B. B., & Nájera-Domínguez, W. (2019). Composición nutricional en hojas de 20 genotipos de *Moringa oleifera* Lam. *Agroproductividad*, 12(9), 29-34.
<https://doi.org/10.32854/agrop.v12i9.1141>
- Doménech, A. G., Durango, V. A., & Ros, B. G. (2017). *Moringa oleifera*: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 67(2), 1-11.
<https://www.alanrevista.org/ediciones/2017/2/art-3/>
- Du, C., Nan, X., Wang, K., Zhao, Y., & Xiong, B. (2019). Evaluation of the digestibility of steam-exploded wheat straw by ruminal fermentation, sugar yield and microbial structure *in vitro*. *Royal Society of Chemistry Advances*, 9, 41775-41782. <https://doi.org/10.1039/C9RA08167D>
- Elghandour, M. M., Vallejo, L. H., Salem, A. Z., Mellado, M., Camacho, L. M., Cipriano, M., Olafadehan, O. A., Olivares, J., & Rojas, S. (2017). *Moringa oleifera* leaf meal as an environmental friendly protein source for ruminants: Biomethane and carbon dioxide production, and fermentation characteristics. *Journal of Cleaner Production*, 165, 1229-1238.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.151>
- Folkard, G., & Sutherland, J. (1996). *Moringa oleifera un árbol con enormes potencialidades*. Leicester, Inglaterra: Universidad de Leicester.
<https://www.yumpu.com/es/document/read/45218270/moringa-oleifera-un-arbol-con-enormes-potencialidades-faorg>
- Gang, G., Chen, S., Qiang, L., Shuan-Lin, Z., Tao, S., Cong, W., Yongxin, W., Qing-Fang, X., & Wen-Jie, H. (2020). The effect of lactic acid bacteria inoculums on *in vitro* rumen fermentation, methane production, ruminal cellulolytic bacteria populations and cellulase activities of corn stover silage. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(3), 838-847.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62707-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62707-3)
- García, D. E., Medina, M. G., Humbria, J., Domínguez, C., Baldizán, A., & Cova, L. (2006). Composición proximal, niveles de metabolitos secundarios y valor nutritivo del follaje de algunos árboles forrajeros tropicales. *Archivos de Zootecnia*, 55(212), 373-384.
- González, V. I. (2013). Guaireña (*Moringa oleifera*). Alternativa forrajera para la ganadería bovina doble propósito en Venezuela. En: Perozo, B. A. (ed). *Manejo de pastos y forrajes tropicales* (pp. 201-207). Maracaibo, Venezuela: Astro Data, S.A.
- Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A. R., Reyes-Vázquez, I., & Mendoza-Núñez, M. A. (2018). Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico

- seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(9), 105-120.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4332>
- Herrera-Pérez, J., Vélez-Regino, L., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Rojas-García, A., & Maldonado-Peralta, M. (2018). Fermentación *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfalos de agua en sustratos fibrosos. *MVZ Córdoba*, 23(3), 6860-6870. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1374>
- Hoffman, P. C., Lundberg, K. M., Bauman, L. M., Shaver, R. D., & Contreras-Govea, F. E. (2007). Digestibilidad *in vitro* del FDN (fibra detergente neutro): el debate de 30 vs 48 horas. *Focus on Forage*, 5(16), 1-4.
<https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2014/01/30vs48esp-FOF.pdf>
- Khang, D. N., Ngoc, A. D., & Preston, T. R. (2019). Effect of cassava leaf meal and coconut cake on methane production in an *in vitro* incubation using cassava root pulp and urea as substrate. *Livestock Research for Rural Development*, 31(8), 128.
<http://www.lrrd.org/lrrd31/8/khang31128.html>
- Ku-Vera, J. C., Castelán-Ortega, O. A., Galindo-Maldonado, F. A., Arango, J., Chirinda, N., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S. S., Flores-Santiago, E. J., Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Piñeiro-Vázquez, A. T., Arceo-Castillo, J. I., Aguilar-Pérez, C. F., Ramírez-Avilés, L., & Solorio-Sánchez, F. J. (2020). Review: Strategies for enteric methane mitigation in cattle fed tropical forages. *Animal*, 14, s453-s463.
<https://doi.org/10.1017/S1751731120001780>
- Luna, M. R., Chacón, M. E., Ramírez, R. J., Álvarez, P. G., Álvarez, P. P., Plúa, P. K., & Álava, M. A. (2015). Rendimiento y calidad de dos especies del género *Pennisetum* en Ecuador. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(8), 1-10.
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63641401005.pdf>
- McCullough, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17, 297-304. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90133-7)
- Mehrez, A. Z., Orskov, E. R., & McDonald, I. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition*, 38, 437-443.
<https://doi.org/10.1079/BJN19770108>
- Melesse, A., Steingass, H., Schollenberger, M., Holstein, J., & Rodehutschord, M. (2017). Nutrient compositions and *in vitro* methane production profiles of leaves and whole pods of twelve tropical multipurpose tree species cultivated in Ethiopia. *Agroforest Systems*, 93, 135-147.
<https://doi.org/10.1007/s10457-017-0110-9>
- Meza, Z., Olivares, E., Gutiérrez, E., Bernal, H., Aranda, J., Vázquez, R., & Carranza, R. (2016). Crecimiento y producción de biomasa de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) bajo las condiciones climáticas del Noreste de México. *Tecnociencia Chihuahua*, 10, 143-153.
<https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/177/541>
- NRC. (1996). *Nutrient requirements of beef cattle* (7th edition). Washington, Estados Unidos: National Academies Press.
- Ojo, V. O., Adeoye, S. A., Oni, A. O., Adelusi, O. O., Yusuf, K. O., Jalaosho, A. O., Olanite, J. A., & Onifade, O. S. (2017). Valor nutritivo de los recursos alimenticios procesados procedentes de pastos naturales en South-West, Nigeria. *Archivos de Zootecnia*, 66(256), 469-474. <https://doi.org/10.21071/az.v66i256.2761>
- Quintanilla-Medina, J., Joaquín-Cancino, S., Martínez-González, J., Limas-Martínez, A., López-Aguirre, D., Estrada-Drouaillet, B., & Hernández-Meléndez, J. (2018). Usos de *Moringa*

- oleifera* Lam. (Moringaceae) en la alimentación de rumiantes. *Agroproductividad*, 11(2), 89-93. <https://core.ac.uk/download/pdf/249320001.pdf>
- Sánchez-Santillán, P., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L. A., Santellano-Estrada, E., & Alarcón-Zúñiga, B. (2015). Fibrinolytic activity and gas production by *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius* - EUM1 in bagasse cane. *MVZ Córdoba*, 20(supl. 2015), 4907-4916. <https://doi.org/10.21897/rmvz.6>
- Sánchez-Santillán, P., & Cobos-Peralta, M. A. (2016). *In vitro* production of volatile fatty acids by reactivated cellulolytic bacteria and total ruminal bacteria in cellulosic substrate. *Agrociencia*, 50(5), 565-574. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30246698002.pdf>
- Sánchez-Santillán, P., Cobos-Peralta, M. A., Hernández-Sánchez, D., Alvarado-Iglesias, A., Espinosa-Victoria, D., & Herrera-Haro, J. G. (2016). Use of activated carbon to preserve lyophilized cellulolytic bacteria. *Agrociencia*, 50(5), 575-582.
- Sánchez-Santillán, P., Torres-Cardona, M. G., Campos-Montiel, R. G., Soriano-Robles, R., Fernández-Luqueño, F., Medina-Pérez, G., Del Razo-Rodríguez, O. E., & Almaraz-Buendía, I. (2018). Potencial de emisión de gases efecto invernadero de plantas forrajeras por fermentación entérica. *Agroproductividad*, 11(2), 40-45.
- Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A. R., Maldonado-Peralta, M. A., & Ayala-Monter, M. A. (2020). *In vitro* gas and methane production and dry matter degradation of pumpkin (*Cucurbita argyrosperma*) silages with pangola grass (*Digitaria decumbens*) hay. *Agroproductividad*, 13(11), 95-101. <https://doi.org/10.32854/agrop.v13i11.1786>
- Sánchez-Santillán, P., Wilson-García, C. Y., López-Zerón, N. E., Saavedra-Jiménez, L. A., Maldonado, P. M., & Melo-Trani, M. Y. (2021). Rendimiento, calidad y biogás *in vitro* en pasto *Megathyrus maximus* cv. Aruana con diferente fertilización. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(II), e2957. <https://doi.org/10.19136/era.a8nII.2957>
- Sandoval, G. L., Miranda, R. L., Lara, B. A., Huerta, B. M., Uribe, G. M., & Martínez, M. M. (2016). Fermentación *in vitro* y la correlación del contenido nutrimental de leucaena asociada con pasto estrella. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16, 3185-3196. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i16.388>
- SAS. (2003). *User's guide: Statistics*. [Software]. Ver. 9.3. Cary, North Carolina., Estados Unidos.
- Soltan, Y. A., Hashem, N. M., Morsy, A. S., El-Azrak, K. M., Nour, E., & Sallam, S. M. (2018). Comparative effects of *Moringa oleifera* root bark and monensin supplementations on ruminal fermentation, nutrient digestibility and growth performance of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 189-201. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.021>
- Texta, N. J., Sánchez-Santillán, P., Hernández, D. S., Torres-Salado, N., Crosby, M. G., Rojas-García, A. R., Herrera-Pérez, J., & Maldonado-Peralta, M. A. (2019). Uso de disacáridos y carbón activado para preservar consorcios de bacterias ruminales celulolíticas liofilizadas. *MVZ Córdoba*, 24(3), 7305-7313. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1412>
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, A. R., Herrera-Pérez, J., & Hernández-Morales, J. (2018). Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia*, 67(257), 55-59. <https://doi.org/10.21071/az.v67i257.3491>
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, R. A., Almaraz-Buendía, I., Herrera-Pérez, J., Reyes-Vázquez, I., & Mayren-Mendoza, F. J. (2019). *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo

- (*Bubalus bubalis*) and Suiz-bu cow. *Agrociencia*, 53, 145-159. <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1775>
- Van Soest, P. J., Robertson, J., & Lewis, B. (1991). Symposium carbohydrate methodology, metabolism and nutritional in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vanegas, J. L., González, J., & Carro, M. D. (2017). Influence of protein fermentation and carbohydrate source on *in vitro* methane production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101, e288-e296. <https://doi.org/10.1111/jpn.12604>