

TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *in vitro* PARA ESTIMAR LA PRODUCCIÓN DE METANO

In vitro GAS PRODUCTION TECHNIQUE USED TO ESTIMATE THE PRODUCTION OF METHANE

Crosby-Galván, M.M.¹; Ramírez-Mella, M.^{2*}

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Programa de Ganadería. Carretera México- Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. ²CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná km 17.5. Sihochac, Champotón, Campeche. C. P. 24450.

*Autor de correspondencia: monicara@colpos.mx

RESUMEN

La producción de gas *in vitro* es una técnica altamente utilizada para evaluar el efecto de alimentos, dietas y aditivos en la fermentación ruminal desde mediados del siglo XX. Más recientemente, esta técnica también se ha utilizado para estimar la producción de metano (CH₄), producto de la fermentación ruminal, ya sea por cromatografía de gases, con un analizador de gases portátil o con una solución de hidróxido de sodio (NaOH). Cualquiera de ellas es útil para predecir el potencial metanogénico de los sustratos o aditivos utilizados en la alimentación de rumiantes; no obstante, cada una tiene sus peculiaridades que es necesario tomar en cuenta al momento de decidir cómo estimar la producción de CH₄ con la técnica de producción de gas *in vitro* (TPGIV).

Palabras clave: Cambio climático, gases de efecto invernadero, CH₄, ganadería.

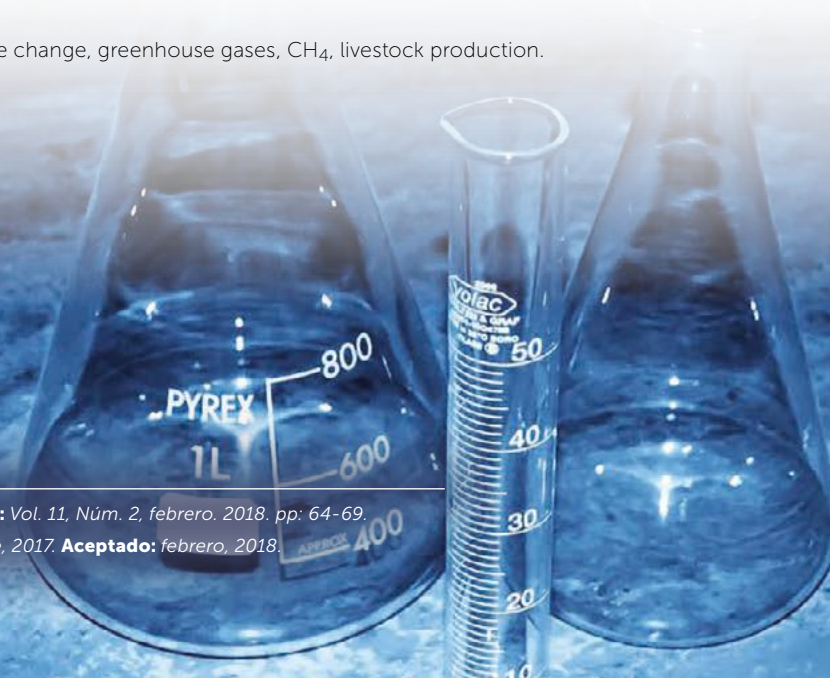
ABSTRACT

Since the mid-twentieth century, *in vitro* gas production is a highly used technique to evaluate the effect of feedstuff, diets and additives on ruminal fermentation. More recently, this technique has also been used to estimate the production of methane (CH₄), product of ruminal fermentation, either by gas chromatography, with a portable gas analyzer, or with a solution of sodium hydroxide (NaOH). Any of them is useful to predict the methanogenic potential of the substrates or additives used in ruminant diets; however, each has its peculiarities that must be taken into account when deciding how to estimate the production of CH₄ with the *in vitro* gas production technique (IVGPT).

Keywords: Climate change, greenhouse gases, CH₄, livestock production.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 2, febrero. 2018. pp: 64-69.

Recibido: diciembre, 2017. **Aceptado:** febrero, 2018.



INTRODUCCIÓN

La técnica de producción de gas *in vitro* (TPGIV) se ha utilizado ampliamente para evaluar el efecto de diferentes forrajes, alimentos, dietas y aditivos en la fermentación ruminal; sin embargo, debido al creciente interés en el Cambio Climático y de la contribución de la ganadería en las emisiones de gases de efecto invernadero, recientemente también se le ha utilizado para estimar metano (CH₄) (Storm *et al.*, 2012; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). El principio de la TPGIV es simular, bajo condiciones controladas de laboratorio, el ambiente ruminal, manteniendo la temperatura, pH, anaerobiosis y aporte de minerales para evaluar la fermentación de diferentes sustratos o aditivos (Storm *et al.*, 2012). De manera general, en la literatura se reportan tres métodos para estimar CH₄ con la TPGIV: una directa, en la cual se colecta una muestra de gas que se inyecta a un cromatógrafo de gases el cual determina la concentración de CH₄, otra indirecta, en donde se inyecta el gas colectado en una solución de NaOH (Fievez *et al.*, 2005), y otra con un analizador de gases portátil que se adapta a los frascos incubados (Elghandour *et al.*, 2017). En todos los casos, es necesario tener acceso a líquido ruminal fresco ya sea de un animal con cánula ruminal (Figura 1) o colectado a través de una sonda gástrica. Por lo anterior, el objetivo de esta revisión es describir de manera general cómo utilizar la TPGIV para medir la producción de CH₄, así como algunas ventajas y desventajas de su uso con respecto a las técnicas *in vivo*.

Breve historia de la técnica de producción de gas *in vitro*

El estudio de la degradación y fermentación ruminal de alimentos midiendo la producción de gas data de mediados del siglo XX cuando McBee (1953) y Hungate (1966) midieron por primera vez la producción de gas en un cultivo de líquido ruminal con el objetivo de evaluar

la actividad microbiana (Rymer *et al.*, 2005). Por esa misma época, Tilley y Terry (1963) realizaron estudios *in vitro* para medir la degradación de sustratos a un punto fijo, pero fue en 1975 cuando Czerkawski y Breckenridge desarrollaron un sistema de desplazamiento de un émbolo por efecto del gas producido en fermentaciones realizadas en una jeringa de vidrio. Posteriormente, en 1979, Menke y colaboradores utilizaron la técnica con jeringas para determinar la fermentación a punto final después de 24 horas de incubación. Esta técnica fue modificada por Blümel y Orskov en 1993 incubando las jeringas en una incubadora rotatoria, estableciendo que si se registraba la producción de gas a intervalos frecuentes se podía determinar la cinética de la fermentación. En lugar de registrar el desplazamiento de un émbolo, también se puede medir la presión de gas, metodología descrita

inicialmente por Wilkins en 1974 y posteriormente por Theodorou y colaboradores en 1994, quienes utilizaron un transductor de presión manual (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). En este último caso, los datos obtenidos de la presión, expresados en kg/cm², se transforman a mL/g de materia seca o materia orgánica fermentada.

En la década de 1990 se desarrollaron diversos métodos automatizados para medir *in vitro* la producción de gas en tiempo real permitiendo un mejor entendimiento de la cinética de fermentación de sustratos. Es importante resaltar que la TPGIV *per se* no mide

las concentraciones de CH₄; es indispensable colectar muestras de gas para analizarlas por alguna técnica analítica como la cromatografía de gases. Como alternativa, Muetzel y colaboradores en 2014 desarrollaron un sistema automatizado de medición de CH₄ el cual se monitorea en tiempo real por cromatografía de gases (Yáñez Ruiz *et al.*, 2016). Más recientemente, Elghandour *et al.* (2017) adaptaron un analizador de gases portátil a la TPGIV para registrar la producción de CH₄. El uso de los analizadores portátiles para medir *in vitro* la producción



Figura 1. Obtención de líquido ruminal fresco de un bovino con cánula permanente. Previamente en el laboratorio se llena un termo con agua destilada a 39 °C. Justo antes de realizar la colecta, el agua del termo se desecha y se coloca el líquido ruminal filtrado con tela tipo gasa dentro del termo. Una vez obtenida la cantidad deseada, se cierra el termo y se transporta inmediatamente al laboratorio para la preparación del inóculo.

de CH₄ pudiera ser una alternativa mucho más económica y accesible que la cromatografía de gases; no obstante, a nuestro conocimiento sólo existe un artículo reportado utilizando este aparato para medición de CH₄.

Generalidades del ambiente ruminal

Para comprender el principio de la TPGIV es necesario conocer algunos aspectos básicos del ambiente ruminal. Los rumiantes se consideran un grupo realmente exitoso de fermentadores debido a que poseen un órgano digestivo especial: el rumen (Madigan *et al.*, 2015). El rumen puede considerarse como un fermentador abierto, en el cual el alimento sufre una transformación a nutrientes que son utilizados por el animal. Para lograr el establecimiento y la actividad eficiente de microorganismos anaerobios, el rumen debe proporcionar un hábitat con características fisicoquímicas que permitan el crecimiento y la actividad de las bacterias, arqueas, protozoarios y hongos que en su mayoría son anaerobios estrictos (Cuadro 1). Cabe señalar que las características fisicoquímicas del rumen pueden variar bajo condiciones de manejo y alimentación (Cobos, 2007).

Dentro del ambiente ruminal, los microorganismos celolíticos hidrolizan la celulosa liberando glucosa. La glucosa experimenta entonces la fermentación bacteriana, con producción de ácidos grasos volátiles (AGVS), principalmente ácido acético, propiónico y butírico y los gases dióxido de carbono (CO₂) y CH₄. Los niveles de AGVS en el rumen en estado estable, son aproximadamente 60 mM de acetato, 20 mM de propionato, y 10 mM de butirato. Dichos AGVS pasan a través de la pared ruminal al torrente sanguíneo y son oxidados en los diferentes tejidos del animal, constituyendo su principal fuente de energía, mientras que los productos gaseosos de la fermentación se liberan por el eructo (Madigan *et al.*, 2015).

La producción de CH₄ en el rumen no tiene un mecanismo exacto, se considera una vía metabólica

única, tomando en cuenta que el paso principal en el aporte de energía se asocia a la reducción del grupo metilo a metano (Mackie *et al.*, 1992; Takahashi, 2005).

La cromatografía de gases para medir metano

La medición de metano ruminal por cromatografía de gases se describió casi desde el surgimiento TPGIV. En 1961, McArthur y Miltimore publicaron por primera vez un análisis completo de los gases del rumen por cromatografía de gases. Posteriormente, Hungate (1967) la utilizó para medir la concentración de hidrógeno y establecer que este gas es un intermediario importante de la metanogénesis ruminal. A partir de ello, se ha utilizado la cromatografía de gases para determinar la concentración de gases ruminales, incluyendo CH₄, bajo diferentes condiciones en una gran cantidad de estudios. Esta técnica analítica es muy rápida y confiable; sin embargo, el elevado costo de un cromatógrafo de gases, incluyendo la columna adecuada así con los gases que el sistema requiere, hace a esta técnica poco accesible.

Uso de hidróxido de sodio para estimar metano

La técnica con NaOH para estimar indirectamente metano en ensayos *in vitro* ha sido utilizada en diversos estudios de nutrición de rumiantes. En todos los casos, la determinación se realiza al final de la fermentación para producción de gas *in vitro* (Kholif *et al.*, 2017; Kulivand y Kafilzadeh, 2015; Tona *et al.*, 2015, Babayemi *et al.*, 2007). Su uso se ha difundido desde que Fievez *et al.*

(2005) demostraron que con esta técnica se puede obtener información precisa de la producción de metano *in vitro* cuando no se cuenta con un equipo de cromatografía (Figura 2). De acuerdo con ellos, la absorción de CO₂ con el NaOH permite tener una predicción precisa del CH₄ producido, con un coeficiente de correlación de concordancia de 0.96. El coeficiente de correlación de concordancia se utiliza comúnmente para evaluar el grado de coincidencia entre dos métodos diferentes para medir

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del ambiente ruminal.

| Concepto | Valor |
|--|-----------|
| Temperatura, °C | 38 a 41 |
| pH | 5.3 a 7.2 |
| Contenido de materia seca, % | 10 a 18 |
| Principales gases disueltos, % | |
| Bióxido de carbono | 65.30 |
| Metano | 26.76 |
| Nitrógeno | 7.0 |
| Oxígeno | 0.56 |
| Hidrógeno | 0.18 |
| Sulfuro de hidrógeno | 0.01 |
| Ácidos grasos volátiles, $\mu\text{mol/mL}$: | |
| - Acético | 66 a 70 |
| - Propiónico | 23 a 25 |
| - Butírico | 15 a 20 |
| - Valérico, isovalérico, isobutírico y 2-metilbutírico | 2 a 4 |
| - Total | 106 a 119 |

Fuente: tomado de Cobos (2007).

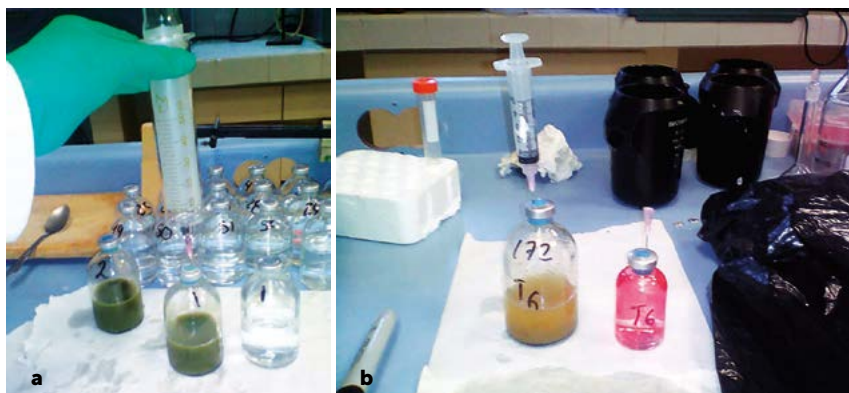


Figura 2. Estimación de metano con la técnica de producción de gas *in vitro*. Figura 2a. Uso de hidróxido de sodio. Con una jeringa de vidrio de 60 mL se colecta el gas producido en los frascos incubados con el inóculo y el sustrato; posteriormente el gas se transfiere a otro vial que contiene una solución de hidróxido de sodio, se agita para asegurar la incorporación del gas en dicha solución y se vuelve a colectar el gas. El gas obtenido del frasco con hidróxido de sodio corresponde a metano más gases menores. Figura 2b. Colecta de gas para cromatografía de gases. Se obtiene una cantidad determinada de gas de los frascos incubados con el inóculo y el sustrato y se transfiere a otro frasco previamente llenado hasta el tope con una solución salina saturada. Deberá colocarse una aguja (como se muestra en la imagen) para que, por desplazamiento, la muestra de gas quede dentro. De este modo la muestra puede almacenarse para posteriormente determinar la concentración de metano por cromatografía de gases.

una misma variable. En el caso de Fievez *et al.* (2005), se midió metano (variable) a través de cromatografía de gases (método 1) y con solución de NaOH (10 M) (método 2).

En el Cuadro 2 se resumen la metodología y los resultados de diversos estudios que utilizan el NaOH para estimar la producción de metano en ensayos *in vitro*, utilizando diferentes sustratos o aditivos. Como puede observarse, en casi todos los casos la estimación de metano se realizó justo después de la última medición de producción de gas, generalmente a las 24 o 48 horas, inyectando la solución de NaOH en el mismo vial.

Ventajas y desventajas de las técnicas *in vitro* para estimar metano en rumiantes

Una de las principales ventajas del uso de la TPGIV para estimar CH₄ es el relativo bajo costo comparado con las mediciones *in vivo*, las cuales requieren de equipos especializados e instalaciones costosas como son las cámaras de respiración o los equipos infrarrojos, o bien resultan ser más complejas como es el caso de la técnica de hexafluoruro de azufre. De acuerdo con Battha *et al.* (2007) y Battha *et al.* (2008) la estimación de metano por cromatografía de gases con la TPGIV está altamente correlacionada con la del hexafluoruro de azufre y con las cámaras de respiración ($R^2=0.71$ en ambos casos),

respectivamente, a las 24 horas. Por otro lado, el uso de hidróxido de sodio hace aún más accesible la estimación de CH₄ de diferentes sustratos y con resultados altamente correlacionados ($R^2=0.98$) con la medición por cromatografía de gases. Asimismo, también se han adaptado a la TPGIV detectores de gas portátiles para medir el CH₄ y CO₂ con resultados confiables (Elghandour *et al.*, 2016). No obstante es importante señalar que estos detectores están fabricados para usarse en la industria alimenticia, cervecera y de hidrocarburos.

Probablemente una de las principales desventajas de la estimación de CH₄ con la TPGIV es que sólo simula la fermentación ruminal sin tomar en cuenta la producción total de CH₄ de todo el animal. Además, no es posible determinar los efectos a largo plazo ya que los estudios

in vitro de este tipo se limitan a periodos no mayores a las 96 horas. Por otro lado, a diferencia de los estudios *in vivo* en los cuales los animales son adaptados a las dietas por periodos de 14 días en promedio, en los ensayos *in vitro* el líquido ruminal se obtiene de un animal con una dieta "estándar" (Storm *et al.*, 2012). De acuerdo con Yáñez-Ruiz *et al.* (2016), se han evaluado una gran cantidad de compuestos antimetanogénicos en estudios *in vitro*, pero pocos son aquellos en los cuales se evalúan simultáneamente *in vitro* e *in vivo*. Además, es importante mencionar que la producción de CH₄ *in vitro* se correlaciona mejor con las emisiones de CH₄ *in vivo* cuando los resultados se expresan por unidad de materia degradada, por lo que los estudios *in vivo* deben realizarse antes de establecer conclusiones que sean resultado únicamente de ensayos *in vitro*.

CONCLUSIONES

La TPGIV ha sido ampliamente utilizada para evaluar la fermentación ruminal de un sinnúmero de dietas, ingredientes o aditivos alimenticios la cual, a lo largo del tiempo se ha modificado para medir la producción de CH₄. Dicha producción de CH₄ puede estimarse ya sea por cromatografía de gases, medidores portátiles o con NaOH. Independientemente de cómo sea la medición, es necesario tomar en cuenta las cualidades y limitantes de cada una de ellas.

Cuadro 2. Resultados de producción de metano de varios estudios *in vitro* utilizando hidróxido de sodio.

| Autor | Sustrato | Modo de uso | Horario | Resultado en la producción de metano |
|--------------------------------|--|---|----------|--------------------------------------|
| Kholif <i>et al.</i> (2017) | Ensilados diversos de paja de trigo, rastrojo de maíz y bagazo de caña, con y sin enzima. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 2 mL de NaOH (10 M). | 48 horas | De 8 a 26 mL/g MS |
| Tona <i>et al.</i> (2015) | Residuos agrícolas como cascarilla de arroz, residuo de frijol, pulpa de cítricos y rastrojo de maíz. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 4 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | De 90 a 170 mL/ g MS |
| Kulivand y Kafilzadeh (2015) | Pastos diversos nativos de Irán. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 2 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | De 47 a 104 mL/g MS |
| Selmi <i>et al.</i> (2011) | Dietas con diferentes cereales como sorgo, trigo y maíz. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 5 mL de NaOH (10 M). | 36 horas | De 30 a 50 mL/g MS |
| Bunglavan <i>et al.</i> (2010) | Extractos herbales de ajo, jengibre, neem, entre otros al 10 % en dietas a base de <i>Pennisetum purpureum</i> . | Se colectaron 2 mL de gas de la última medición y se inyectaron en una jeringa con 2 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | De 9 a 27 mL/g MS |
| Ogunbosoye y Babayemi (2010) | Follaje de diversos árboles no leguminosos. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 4 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | De 40 a 90 mL/ g MS |
| Babayemi (2007) | Leguminosas, pastos y follaje de árboles diversos. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 4 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | De 93 a 125 mL/g MS |
| Babayemi (2006) | Hojas, semillas y frutos de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> . | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 4 mL de NaOH (10 M). | 30 horas | De 75 a 150 mL/ g MS |
| Babayemi y Bamikole (2006) | Hojas de <i>Tephrosia candida</i> de diferentes estados de madurez. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 4 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | 29.3 a 234 mmol |
| Babayemi <i>et al.</i> (2006) | Hojas de té y residuo de hojas de té. | Después de la medición final de la fermentación para producción de gas, se agregaron 4 mL de NaOH (10 M). | 24 horas | 117 a 352 μ mol |

AGRADECIMIENTOS

Este artículo forma parte del proyecto No. 417 de la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para Atención a Problemas Nacionales 2015 de CONACYT.

LITERATURA CITADA

- Babayemi O.J. 2006. Antinutritional factors, nutritive value and *in vitro* gas production of foliage and fruit of *Enterolobium cyclocarpum*. *World Journal of Zoology* 1: 113-117.
- Babayemi O.J. 2007. *In vitro* fermentation characteristics and acceptability by West African dwarf goats of some dry season forages. *African Journal of Biotechnology* 6: 1260-1265.
- Babayemi O.J., Bamikole M.A. 2006. Effects of *Tephrosia candida* DC leaf and its mixtures with guinea grass on *in vitro* fermentation changes as feed for ruminants in Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition* 5: 14-18.
- Babayemi O.J., Hamzat R.A., Bamikole M.A., Anurudu N.F., Olomola O.O. 2006. Preliminary studies on spent tea leaf: *in vitro* gas production as affected by chemical composition and secondary metabolites. *Pakistan Journal of Nutrition* 5: 497-500.
- Battha R., Enishi O., Takusari N., Higuchi K., Nonaka I, and Kurihara M. 2008. Diet effects on methane production by goats and comparison between measurement methodologies. *Journal of Agricultural Science* 146: 705-715.
- Battha R., Tajima K., Takusari N., Higuchi K., Enishi O., Kurihara M. 2007. Comparison of *in vivo* and *in vitro* techniques for methane production from ruminant diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 20: 1049-1056.
- Bunglavan S.J., Valli C., Ramachandran M., Balanrishnan V. 2010. Effect of supplementation of herbal extracts on methanogenesis in ruminants. *Livestock Research for Rural Development* 22. Article 216. Disponible en <http://www.lrrd.org/lrrd22/11/bung22216.htm>
- Cobos Peralta M. A. 2007. Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Ed. Trillas. México. pp. 502-503.
- Elgahndour M., Vázquez J.C, Salem A.Z.M, Kholif A.E, Cipriano M.M., Camacho L.M., Márquez O. 2017. *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Animal Research* 45: 389-395.

- Fieves V., Babayemi O.J., Demeyer D. 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*: 197-210.
- Hungate R.E. 1967. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Archiv für Mikrobiologie* 59: 158-164.
- Kholif A.E., Elghandour M.M.Y., Rodríguez G.B., Olafadehan O.A., Salem A.Z.M. 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *Journal of Cleaner Production* 142: 2649-2655.
- Kulivand M., Kafilzadeh F. 2015. Correlation between chemical composition, kinetics of fermentation and methane production of eight pasture grasses 37: 9-14.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A. 2015. *Brock Biología de los microorganismos*. Ed. Pearson Educación S. A. Madrid. pp. 738-739.
- Mackie R.I., White B.A., Bryant M.P. 1992. Methanogenesis, *Biochemistry*. En: *Encyclopedia of Microbiology* Lederbeg, J. ED. Academia Press, San Diego, CA, USA. p. 97
- McArthur J.M., Miltimore J.E. 1961. Rumen gas analysis by gas-solid chromatography. *Canadian Journal of Animal Science* 41: 187-196.
- Ogunbosoye D.O., Babayemi O.J. 2010. Potential values of some non-leguminous browse plants as dry season feed for ruminants in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 9: 2720-2726.
- Rymer C. Huntington J.A., Williams B.A., Givens D.I. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 9-30.
- Selmi H., Ben Gara A., Rekik B., Rouissi. 2011. Effect of the concentrate feed on *in vitro* gas production and methane in silico-sarde sheep. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 10: 346-350.
- Storm I., Hellwing A., Nielsen N., Madsen J. 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals* 2: 160-183.
- Takahashi J. 2005. Emission of GhG from livestock production in Japan. 2nd International Conference on Greenhouse gases and Animal Agriculture. Soliva, C. R. Takahashi J. & Kreuzer M. Eds. Publication Series. Institute of animal Science. ETH Zurich, Switzerland. p. 30
- Tona G.O., Ogunbosoye D.O. Ayano M.O. 2015. Nutritive value assessment of four crop residues by proximate composition and *in vitro* rumen fermentation techniques. *International Journal of Applied Agricultural and Apicultural Research* 11: 123-129.
- Yáñez-Ruiz D.R., Bannink A., Dijkstra J., Kebreab E., Morgavi D.P., O'Kiely P., Reynolds C.K., Schwarm A., Shingfield K.J., Yu Z., Hristov A.N. 2016. Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants: A review. *Animal Feed Science and Technology* 216: 1-18.

