



Reseña

Producción de Gas *in vitro* con líquido ruminal o heces como inóculo, una técnica de gran utilidad para la evaluación de alimento para rumiantes

Gas production *in vitro* with ruminal fluid or feces as inoculum, a very useful technique for the evaluation of feed for ruminants

Silvio J. Martínez Sáez *, Enrique Espinosa Sifontes *, Danays Palacio Collado *, Redimio M. Pedraza Olivera *

*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba.

Correspondencia: Silvio.martinez@reduc.edu.cu

Recibido: Octubre, 2023; Aceptado: Diciembre, 2023; Publicado: Enero, 2024.

RESUMEN

Antecedentes: Dada su importancia para evaluar la digestibilidad de los alimentos para rumiantes, el artículo se propuso brindar información sobre algunos aspectos generales del desarrollo de la técnica de producción de gas *in vitro* y referirse a los usos que hoy día se dan a la misma. **Desarrollo:** Los orígenes de la técnica se remontan a los trabajos en 1979. Desde entonces ha habido cambios en su forma de aplicarla manteniendo la esencia de medir la producción de gas que se produce cuando se inocula la muestra con líquido ruminal, heces o enzimas en un medio mineral amortiguado por bicarbonatos que libera una cantidad de gas proporcional a los ácidos grasos volátiles producidos. La forma en que se mide la cantidad de gas ha cambiado hasta llegar a la utilización de transductores que se acoplan a computadoras. La técnica ha sido usada para múltiples estudios que se reseñan en el artículo, a la par que la referencia a algunos trabajos dedicados a su perfeccionamiento a partir de dificultades que se presentaron. **Conclusiones:** Se concluye que la técnica *in vitro* de producción de gases es probablemente la herramienta más versátil de medición de la digestibilidad; presenta procedimientos didácticos y accesibles; acarrea menos costos; además representa una alternativa más compatible para las legislaciones de bienestar animal, al usar las heces como inóculo, y que queda aún por hacer para lograr una mejor precisión y exactitud y la posible aplicación en otros campos de evaluación de los alimentos para animales.

Palabras clave: digestibilidad, ética animal, evaluación de alimentos, heces depuestas (*Fuente: AIMS*)

Como citar (APA) Martínez Sáez, S., Espinosa Sifontes, E., Palacio Collado, D., & Pedraza Olivera, R. (2024). Producción de Gas *in vitro* con líquido ruminal o heces como inóculo, una técnica de gran utilidad para la evaluación de alimento para rumiantes. *Revista de Producción Animal*, 35(3). <https://rpa.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4588>



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

ABSTRACT

Introduction: Given its importance in evaluating the digestibility of ruminant foods for ruminants, the paper aimed to bring information on some general aspects of the *in vitro* gas production technique and refers to the uses that are given to it. **Development:** The origins of the technique date back to the work in 1979. Since then there have been changes in the way it is applied, maintaining the essence of measuring the gas production that occurs when the sample is inoculated with rumen fluid, feces or enzymes in a buffered mineral medium based on bicarbonates that releases an amount of gas proportional to the volatile fatty acids produced. The way in which the amount of gas is measured has changed till the now mainly used transducers that are coupled to computers. The technique has been used for multiple studies that were reviewed, as well as some works dedicated to its improvement based on difficulties that arose. **Conclusions:** It is concluded that the *in vitro* gas production technique is probably the most versatile tool for measuring digestibility; it presents didactic and accessible procedures; entails fewer costs and also represents a more compatible alternative for animal welfare legislation, by using voided feces as inoculum and that still needs more to be done in order to achieve better precision and accuracy, and the possible application in other fields of animal food evaluation. **Key words:** digestibility, animal ethics, food evaluation, voided feces (*Source: AIMS*)

INTRODUCCIÓN

El mejor reflejo del valor nutritivo de un alimento es la respuesta productiva de los animales que lo utilizan. Tradicionalmente se afirma que depende, fundamentalmente, de factores tales como su consumo, composición química y la digestibilidad (Baumont *et al.*, 2000).

La evaluación de los alimentos debe definir las características que permiten predecir el comportamiento productivo del animal como la ganancia de peso, la producción de leche, el crecimiento de la lana, etc. En tal sentido, las técnicas con cada vez mayor presencia del trabajo de laboratorio y menor uso de animales han venido ganando terreno debido a su rapidez y relativamente bajo costo (Posada y Noguera, 2005). Usualmente, se usa el término digestibilidad para representar la cantidad de materias secas y/o nutrientes que son absorbidos en el tracto gastrointestinal del total consumido por el animal,

Tanto como la degradabilidad ruminal o *in sacco*, las técnicas de digestibilidad *in vitro* y más específicamente la de producción de gas han ido cobrando cada vez mayor importancia (Ayasan *et al.*, 2018). El presente trabajo pretende recopilar información sobre algunos aspectos generales de la técnica y referirse al alcance que hasta hoy día ha tenido la misma.

DESARROLLO

Breve bosquejo y desarrollo histórico

La técnica llamada de gas *in vitro* (GIV) desarrollada por Menke *et al.* (1979) quedó para la historia como método estándar al ser adoptado por el sistema alemán de evaluación de alimentos. Los recipientes de incubación, jeringuillas o botellas, se colocan en un baño de agua regulado a 39 ± 0.5 °C. La producción de gas que se produce cuando se inocula la muestra con líquido

ruminal, heces o enzimas en un medio mineral amortiguado por bicarbonatos que libera una cantidad de gas proporcional a los ácidos grasos volátiles producidos. Para forrajes, el tiempo de lectura generalmente utilizado es después de 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, pero para concentrados es necesario leer más frecuentemente en las primeras 24 horas. Las lecturas en intervalos de una hora elevan notablemente la precisión, lo que permite obtener también una descripción más exacta de la fase *lag* (Mauricio *et al.*, 2001; Sobalvarro *et al.*, 2020; Juraci *et al.*, 2023).

Por otro lado, en época tan temprana como 1974, se había descrito un criterio diferente para la medición de la producción de gas *in vitro* (Wilkins, 1974) que consistía en mantener la fermentación en un recipiente sellado y medir la presión en el espacio “vacío”. El principio de medir la presión con sensor apropiado ha sido ampliamente adoptado con diferentes variantes. La más simple fue descrita por Theodorou *et al.*, (1994) y consiste en medir manualmente la presión con el uso de un transductor. Estos autores propusieron un sistema semiautomático en el cual los sustratos se incuban en frascos sellados donde los gases de la fermentación se acumulan en el espacio superior y se usa una combinación de jeringa/transductor de presión para medir y liberar el gas acumulado hasta restaurar la presión atmosférica en el interior del frasco. Se usan las mediciones de presión del gas acumulado en el espacio superior para generar estimados del volumen de gas.

A diferencia de los sistemas completamente automáticos, que combinan cada botella con su propio transductor de presión, este utiliza un único transductor que manualmente se traslada a todos los frascos de fermentación. Las principales ventajas del sistema son su elevada capacidad, bajo costo y su fácil mantenimiento. Métodos con el uso de transductores, más o menos automatizados han sido descrito por varios autores (Van Gelder *et al.*, 2005; Van Laar *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2017).

La mayor innovación de la técnica de GIV es que se mide la producción de gas de la muestra en lugar de su degradación (Posada y Noguera, 2005); el mismo postulado continúa hasta hoy, aun cuando el método ha sido simplificado, mejorado y automatizado con el auxilio de las computadoras (García *et al.*, 2022)

Heces como inóculo

En la búsqueda por encontrar inóculos alternativos al líquido ruminal las heces han ocupado un lugar preponderante (Bauer *et al.*, 2004; Youssef y Kamphues, 2018).

En fecha temprana Jones y Barnes (1996) llevaron a cabo estudios de digestibilidad de la materia seca *in vitro* de leguminosas tropicales con fluido ruminal y heces bovinas como fuente de inóculo. Los valores de digestibilidad obtenidos con el uso de fluido fecal fueron linealmente correlacionados con aquellos obtenidos con fluido ruminal ($r=0.98$).

En trabajos comparativos entre heces de vacas y líquido ruminal, Akhter *et al.* (1999) concluyen que las primeras pueden ser una alternativa a los segundos en la evaluación de la digestibilidad *in vitro* de forrajes. Resultados similares fueron publicados por Martínez *et al.* (2008); Sáenz *et al.* (2022).

Las heces de vaca y ovejas han sido utilizadas como inóculo alternativo y su potencial en las técnicas de gas *in vitro* establecido (Varadyová *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2005; Posada *et al.*, 2012; Pandian *et al.*, 2016; Sáenz *et al.*, 2022).

El empeño ha estado motivado más que otra cosa por cuestiones bioéticas como los animales quirúrgicamente modificados.

La influencia del inóculo

Entre los factores muy a tener en cuenta en la producción de GIV ya sea con líquido ruminal (LR) o heces es determinante controlar la variabilidad que muestra el inóculo (Martínez *et al.*, 2005).

En tal sentido, son prácticas comunes, mezclar inóculos provenientes de diferentes animales e introducir muestras de referencia para corregir las diferencias debidas a la influencia del inóculo (Mauricio *et al.*, 2001; Posada y Noguera, 2005; Martínez *et al.*, 2010).

Los criterios generalmente aplicados son que al igual que los blancos (jeringas o transductores sin muestra), los estándares o muestras de referencia deben ser corridos en cada experimento. Cada muestra de referencia ha de tener un perfil de gas conocido, determinado por promedio de muchas réplicas. Si la muestra de referencia incluida dentro de una corrida produce entre el 90 y el 110% del gas con respecto al valor promedio, entonces el fluido ruminal es calificado como "normal" y todas las medidas de volumen de gas son corregidas por el factor "promedio del volumen de la muestra de referencia/volumen de la muestra en la corrida". Si, por el contrario, el volumen de la muestra de referencia en la corrida está situado por fuera de este rango, el inóculo se clasifica como "alterado" y los datos de la corrida se suelen desechar (Schofield, 2000).

La preparación de muestras de referencia lo suficientemente estables y homogéneas es una necesidad. El uso de estándar interno tiene como importante limitante que la muestra que se use como referencia debe tener un perfil similar a la que se analiza, en aras de que se puedan extrapolar los resultados. Por otro lado, ha de cuidarse de preparar siempre nuevas muestras cuando aún hay suficiente cantidad de las que se pretendan reemplazar para lograr un vínculo confiable entre ambas. La calibración externa dependerá de contar con un buen número de muestras cuya digestibilidad *in vivo* o *in sacco* haya sido bien determinada (Kamalak *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Sharifi *et al.*, 2019). La producción de tales muestras es costosa por lo que la colaboración entre laboratorios es esencial (Rymer *et al.*, 2005).

Experimentos realizados por Mauricio *et al.* (1998; 2001), con el fin de comparar líquido ruminal y heces extraídas como fuente de inóculo, mostraron que con la materia fecal se aprecian mayores fases lag y una menor capacidad de fermentación. En trabajos posteriores (Martínez *et al.*, 2005 y 2008; Sharifi *et al.*, 2019) llegaron a igual resultado, los primeros autores con el uso de heces depuestas, lo que agrega la ventaja de prácticamente no tocar al animal.

El uso de un inóculo más concentrado o de mayor cantidad de inóculo fecal y el mejoramiento de la actividad fermentativa de los microorganismos ha sido también investigado (Cubillas, 2010; Cantet *et al.*, 2020). Estos últimos autores encontraron que un pretratamiento del inóculo en aras de aumentar su fuerza no era una solución viable.

Otros inóculos

Cultivos de microorganismos apropiados podrían, en teoría, ser usados para producir inóculos estandarizados sin el uso de animales experimentales. Tales cultivos podrían ser preparados con un amplio rango de actividad que se pueden crear las condiciones para mantenerlos como tal. Rymer *et al.* (2000) investigaron el uso de cultivos bacteriales con la mezcla de varios microorganismos y compararon los patrones producción de gas de varios alimentos. Encontraron que, aunque hay diferencias en la forma de los perfiles con los cultivos bacterianos en que se produce gas a velocidades mucho más bajas que con los inóculos de líquido ruminal, hubo una alta correlación entre los parámetros. Aún queda por avanzar en este sentido

Elías *et al.* (2005) reportan una metodología para la determinación exitosa de la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica *in vitro* mediante la utilización de "células lavadas" (bacterias extraídas de líquido ruminal con la ayuda de la centrifugación). Esta alternativa puede ser probada para producción de gas *in vitro*. Basados en ese criterio, Cubillos *et al.* (2010) propusieron medir la fuerza del inóculo de heces bovinas depuestas y usar una cantidad inversamente proporcional a dicha fuerza.

Además se han usado heces de equinos (Elghandour *et al.*, 2016; Franzan *et al.*, 2018) y caprinos (Martínez, 2014).

Alcances de la técnica

La tabla que se muestra a continuación ofrece una medida de la versatilidad de la técnica de gas *in vitro*:

| Tema | Autor (es) |
|--|--|
| Relación con heces -LR | Martinez <i>et al.</i> (2005); Posada <i>et al.</i> (2012); Pandian <i>et al.</i> (2016); Sáenz <i>et al.</i> (2022). |
| Energía metabolizable | Leon (2012); Muizzu y Rizca (2021); Sáenz <i>et al.</i> (2023). |
| Ordenamiento de forrajes | Martinez <i>et al.</i> (2009). |
| Efecto de polifenoles uso PEG | Martínez (2008); Putri <i>et al.</i> (2021). |
| Predecir consumo | Rodríguez (2017). |
| Evaluación de ensilajes | Ligoski (2020). |
| Producción de metano | Pal <i>et al.</i> (2015); Molho-Ortiz <i>et al.</i> (2019); Ligoski (2020); Sucu (2020); Ellis <i>et al.</i> (2020); Kusuma (2022); Wangui <i>et al.</i> (2022). |
| Uso de probióticos, | Besharati <i>et al.</i> (2009); Elghandour <i>et al.</i> (2016); Sucu (2020). |
| Uso de prebióticos (manano oligosacáridos) | Zheng <i>et al.</i> (2019). |
| Heno de materiales alternativos | Sari <i>et al.</i> (2021) |
| Empleo de fito químicos | Molho-Ortiz <i>et al.</i> (2019). |
| Empleo de enzimas fibro, amilo y proteolíticas | Freiria <i>et al.</i> (2018). |
| Uso de concentrados | Ayasan <i>et al.</i> (2018); <u>Amanzougarene</u> y Fondevila (2020). |
| Uso de bloques multinutricionales | Herrera-Torres <i>et al.</i> (2022). |

Como puede apreciarse, en los últimos años ha predominado el uso de la técnica para la búsqueda de vías que permitan el control del metano como principal gas de efecto de invernadero producido por los rumiantes.

Llama la atención que el estudio de la relación entre líquido ruminal y heces se ha estado estudiando prácticamente desde que surgió la técnica y aún continúa haciéndose.

CONCLUSIONES

La técnica *in vitro* de producción de gases es probablemente la herramienta más versátil de medición de la digestibilidad; presenta procedimientos didácticos y accesibles; acarrea menos costos; además representa una alternativa más compatible para las legislaciones de bienestar animal, al usar las heces como inóculo. Se ha aplicado con éxito para diversos propósitos en la evaluación de alimentos para rumiantes, incluido el cálculo de la digestibilidad de la materia orgánica, la energía metabolizable de los alimentos y la cinética de su fermentación; determinar cómo el valor del alimento se ve afectado por los factores antinutritivos y los aditivos, etc.

Esta técnica puede medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, la presión de gas a un volumen fijo, o una combinación de ambos procedimientos, empleando metodologías manuales, semiautomáticas y automáticas.

REFERENCIAS

- Akhter, Owen, Theodorou, Butler, & Minson. (1999). Bovine faeces as a source of micro-organisms for the *in vitro* digestibility assay of forages. *Grass and forage science*, 54(3), 219-226. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2494.1999.00174.x>
- Akhter, S., Owen, E., & Hossain, M. M. (1996). Use of cow faeces at different times after being voided as a source of micro-organisms for *in vitro* digestion of forages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 9(4), 371-374. <https://www.animbiosci.org/upload/pdf/9-54.pdf>
- Amanzougarene, Z., & Fondevila, M. (2020). Fitting of the *in vitro* gas production technique to the study of high concentrate diets. *Animals*, 10(10), 1935. <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/10/1935>
- Ayasan, Tugay., Ulger, I., Kaliber, M., Ergül, Ş., İnci, H., Mart, D., & Türkeri, M. (2018). Comparison of *in vitro* gas production, nutritive value, metabolizable energy and organic matter digestibility of some chickpea varieties. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8, 31-136. https://www.researchgate.net/publication/323723786_Comparison_of_in_vitro_gas_production_nutritive_value_metabolizable_energy_and_organic_matter_digestibility_of_some_chickpea_varieties

- Baumont, R., Pache, S., Meuret, M. y Morand-Fehr, P., (2000). How forage characteristic influence behaviour and intake in small ruminants: a review. *Livestock Production Science* 64: 15-28.
- Bauer, E., Williams, B. A., Bosch, M. W., Voigt, C., Mosenthin, R., & Verstegen, M. W. (2004). Differences in microbial activity of digesta from three sections of the porcine large intestine according to *in vitro* fermentation of carbohydrate-rich substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15), 2097-2104. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.1845>
- Besharati, M., Taghizadeh, A., & Ansari, A. (2009). Efecto de la adición de diferentes niveles de probióticos en la producción de gas *in vitro*. *Actas de la Sociedad Británica de Ciencia Animal*, 187. <http://dx.doi.org/10.1017/s175275620003026x>
- Cantet, J. M., Colombatto, D., Wawrzkievicz, M., & Jaurena, G. (2020). Pre-incubation of ruminal inocula to assess *in vitro* gas production and digestibility. *Ciência Rural*, 50. <https://www.scielo.br/j/cr/a/cSbf33kvsh7TfCQQnw7wbLt/?lang=en>
- Cubillos Cerquera, A., Sáez, S. J. M., Olivera, R. M. P., & León, M. (2010). Indicadores correlacionados con la fuerza del inóculo de heces bovinas en la producción de gas *in vitro*. *Revista de Producción Animal*, 22(1), 7-10. <https://core.ac.uk/download/pdf/268092631.pdf>
- Elghandour, M. M., Kholif, A. E., López, S., Mendoza, G. D., Odongo, N. E., & Salem, A. Z. (2016). *In vitro* gas, methane, and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. *Journal of Equine Veterinary Science*, 38, 64-71. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080615300769>
- Elías, A., Ortiz, A., Valdiviá, M., & Herrera, F. (2005). Influencia del tipo de cama en la digestibilidad *in vitro* de paja determinada por células lavadas sin líquido ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39(4), 611-618. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017719012.pdf>
- Ellis, Jennifer L., Alaiz-Moretón, H., Navarro-Villa, A., McGeough, E.J., & Purcell, C. (2020). Aplicación de métodos de metaanálisis y aprendizaje automático a la predicción de la producción de metano a partir de la fermentación *in vitro* de microorganismos ruminales mixtos. *Animales*, 10(4), 720. <http://dx.doi.org/10.3390/ani10040720>
- Franzan, B. C., Franco, T. W., Stefani, G., Pereira, M. M., Almeida, F. Q. D., & Silva, V. P. (2018). Equine fecal inoculum optimization in *in vitro* fermentation assays of dehydrated roughage. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47. <https://www.scielo.br/j/rbz/a/VrQzJbh5bL4QZQPPmWHpBkx/?lang=en>
- Freiria, L. B., Zervoudakis, J. T., de Paula, N. F., da Silva Cabral, L., Tedeschi, L. O., da Rosa, P. I. J. L., ... & Possamai, A. J. (2018). Enzimas fibrolíticas, amilolíticas e proteolíticas influenciam as características de fermentação *in vitro* de forragem?. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(3), 1143-1154. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1143>

- García Avila, Y., Torres Martínez, M., & Rodríguez Hernández, R. (2022). ProGas v1. 1: Programa para el preprocesamiento y análisis de datos de producción de gas *in vitro* de alimentos para rumiantes. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 56(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-34802022000200004&script=sci_arttext&tlng=pt
- Herrera-Torres, E., Pámanes-Carrasco, G., Araiza-Rosales, E., Sánchez-Arroyo, F., Palacios-Torres, M., Murillo-Ortiz, E. (2022). Producción de gas *in vitro*, fermentación ruminal y comportamiento productivo de novillos alimentados con bloques multinutricionales de tuna. *J. Anim. and Feed Sciences*, 31(3), 258-264. DOI: <https://doi.org/10.22358/jafs/149991/2022>
- Youssef, I. M., & Kamphues, J. (2018). Fermentation of lignocellulose ingredients *in vivo* and *in vitro* via using fecal and caecal inoculums of monogastric animals (swine/turkeys). *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 7(4), 407-413. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314853517301750>
- Jones, R. J., & Barnes, P. (1996). *In vitro* digestibility assessment of tropical shrub legumes using rumen fluid or faecal fluid as the inoculum source. *Tropical Grasslands*, 30, 374-377. https://www.tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Historic/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/Abstracts/Vol_30_1996/Abs_30_04_96_pp374_377.html
- Juraci M. A., Suassuna, J., Andrade, A. P. D., Menezes, D. R., Teles, Y. C., Araujo, C. M., Lima, L. K., ... & Medeiros, A. N. (2023). Accuracy of Techniques for Predicting Gas Production by Ruminants Associated with Diet. *Fermentation*, 9(1), 39. <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/1/39>
- KAMALAK, A. D. E. M. (2005). COMPARISON OF *IN VITRO* GAS PRODUCTION TECHNIQUE WITH IN SITU NYLON BAG TECHNIQUE TO ESTIMATE DRY MATTER DEGRADATION. [HTTPS://ACIKERISIM.ULUDAG.EDU.TR/ITEMS/11448B4C-2C3D-49D2-BC09-1F827337AAC6](https://acikerisim.uludag.edu.tr/items/11448b4c-2c3d-49d2-bc09-1f827337aac6)
- Kusuma, J. W., Tuti, I. N., Handayanta, E., Hanifah, A., & Hadi, R. F. (2022, March). Evaluation of gas production kinetics from phyllode and acacia plant (*Acacia mangium*) pod through fermentation by *in vitro* gas test. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1001(1). <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/1001/1/012001>
- León González, M., Sáez, S. J. M., Olivera, R. M. P., Pérez, C. E. G., & Argilagos, G. B. (2002). Correlación entre energía metabolizable calculada y producción de gas *in vitro* con heces depuestas como inóculo. *Revista de Producción Animal*, 14(2). <https://core.ac.uk/download/pdf/327252008.pdf>
- Ligoski, B., Gonçalves, L. F., Claudio, F. L., Alves, E. M., Krüger, A. M., Bizzuti, B. E., ... & Paim, T. D. P. (2020). Silage of intercropping corn, palisade grass, and pigeon pea increases protein content and reduces *in vitro* methane production. *Agronomy*, 10(11), 1784. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10111784>

- Martínez, D. A., Vargas-Bayona, J. E., Morales, E., & Melgarejo, L. M. (2014). Estandarización de la técnica de producción de gas *in vitro* con heces caprinas en la degradación de la materia seca en forrajes tropicales. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 4, 240-242.
https://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2014/Trabajo086_AICA2014.pdf
- Martínez, S.J., Olivera, R. M. P., Pujal, A. R., Viera, G. G., Pérez, C. E. G., & González, M. L. (2008). Correlación degradabilidad ruminal *in situ* y producción de gas *in vitro* con el uso de heces vacunas depuestas como inóculo. *Revista de Producción Animal*, 20(2).
<https://core.ac.uk/download/pdf/268092712.pdf>
- Martínez S J., Olivera, R. M. P., González, M. L., Pérez, C. E. G., & Viera, G. G. (2005). Influence of the donor animal on the *in vitro* gas production with the use of voided bovine faeces. *Development*, 17, 11. <https://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd17/11/mart17129.htm>
- Martínez S.J., Olivera, R. M. P., Viera, G. F. G., Pérez, C. E. G., & González, M. L. (2009). Ordenamiento de 13 forrajes según su producción acumulada de gas *in vitro* con heces bovinas depuestas como inóculo. *Revista de Producción Animal*, 21(1).
<https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA466298110&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=02586010&p=IFME&sw=w&userGroupName=anon%7E36a42b1&aty=open-web-entry>
- Martínez, S.J., Pedraza Olivera, R.M., Guevara Viera, G., León González, M., & Estevez Alfayate, J.A. (2005). Implementación de la técnica de producción de gas *in vitro* con heces vacunas como inóculo y su empleo para evaluar el follaje de algunas leguminosas arbustivas
https://www.researchgate.net/publication/328967827_Implementacion_de_la_tecnica_de_produccion_de_gas_in_vitro_con_heces_vacunas_como_inoculo_y_su_empleo_para_evaluar_el_follaje_de_algunas_leguminosas_arbustivas
- Martínez, S. J., González Pérez, C. E., León González, M., Pedraza Olivera, R. M., & Loyola Hernández, O. (2008). Uso de PEG4000 para evaluar la influencia de los polifenoles en la producción de gas *in vitro* con heces vacunas como inóculo. *Zootecnia Tropical*, 26(3), 261-264.
https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692008000300022&script=sci_arttext
- Mauricio, R. M., Owen, E., Mould, F. L., Givens, I., Theodorou, M. K., France, J., ... & Dhanoa, M. S. (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*, 89(1-2), 33-48.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840100002340>
- Mauricio, R., Abdalla, A. L., Mould, F. L., Altaf, U. R., Smith, T., Owen, E., ... & Theodorou, M. K. (1998). Comparison of bovine rumen liquor and faeces as sources of micro-organisms for the *in vitro* gas production technique assessed using twelve graminaceous forages. In *Proceedings of the British Society of Animal Science* (Vol. 1998, pp. 68-68). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1752756200597208>

- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1), 217-222. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1364233268530090624>
- Molho-Ortiz, A. A., Romero-Pérez, A., Ramírez-Bribiesca, E., Marquez-Mota, C., Ramírez-Orejuel, J. C., & Corona, L. (2019). PSXIV-13 Effect of phytochemicals on *in vitro* rumen fermentation and methane production. *Journal of Animal Science*, 97(Supplement_3), 445-446. <http://dx.doi.org/10.1093/jas/skz258.877>
- Muizzu, Rizca, A., Kusherawaty, S., & Soetanto, H. (2021). *In vitro* gas production and its prediction on metabolize energy of complete feed using rumen fluid of three Indigenous cattle as inoculum taken from abattoir. *J. Ilmu-Ilmu Peternakan*, 31, 168-74. <https://jiip.ub.ac.id/index.php/jiip/article/view/948>
- Pal, K., Patra, A. K., & Sahoo, A. (2015). Evaluation of feeds from tropical origin for *in vitro* methane production potential and rumen fermentation *in vitro*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(3), 14. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2015133-7467>
- Pandian, C. S., Reddy, T. J., Sivaiah, K., Blummel, M., & Reddy, Y. R. (2016). Faecal matter as inoculum for *in vitro* gas production technique. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 16(2), 271-282. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:anft&volume=16&issue=2&article=007>
- Posada, S. L., & Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 17(4), 12-19. <https://lrrd.cipav.org.co/lrrd17/4/posal7036.htm>
- Posada, S., Noguera, R., & Segura, A. (2012) Heces de rumiantes utilizadas como inóculo para la técnica de producción de gas *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(4). <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.324801>
- Posada, S. L., & Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 17(4), 12-19. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posal7036>
- Putri, W., Noviandi, Q., & Kustantinah, K. (2021). Nivel de modificación del polietilenglicol en la producción de piensos con gas *in vitro* ". *Materiales clave de ingeniería*, 884, 178–83. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.884.178>
- Resillez**, A. R., Olivera, R. P., Viera, R. G., Sáez, S. M., & Rodríguez, M. G. (2009). Beneficio económico del empleo de heces bovinas depuestas como inóculo en la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar alimentos. *Revista de Producción Animal*, 21(2), 175-177. <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA466298189&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=02586010&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E54a87630&aty=open-web-entry>
- Rodríguez, R., Galindo, J. L., Iraola, J., & Gómez, S. (2017). Uso de la técnica de producción de gas para predecir la relación entre el nivel de consumo e indicadores de la fermentación

- ruminal *in vitro*. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(3), 301-310. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-34802017000300003&script=sci_arttext
- Rymer, C., & Givens, D. I. (2000). Predicting the *in vitro* gas production profile of dried grass with strained rumen fluid from the *in vitro* gas production profile of dried grass with faeces. In *Proceedings of the British Society of Animal Science*, 48-48. <https://doi.org/10.1017/S1752756200000491>
- Rymer, C., Williams, B. A., Brooks, A. E., Davies, D. R., & Givens, D. I. (2005). Inter-laboratory variation of *in vitro* cumulative gas production profiles of feeds using manual and automated methods. *Animal feed science and technology*, 123, 225-241. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840105001690>
- Sáenz Barrera, S., Bernal Barragán, H., Vásquez Aguilar, N. C., González Rodríguez, H., García Pérez, O. D., & Cruz López, A. (2022). Efecto del inóculo (líquido ruminal o excreta) sobre la producción de gas *in vitro* en alimentos para ovinos. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8658803>
- Sari, R. W. W., Jamarun, N., & Yanti, G. (2021, November). Mangrove (*Avicennia marina*) leaves as an alternative feed resources for ruminants. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 888, No. 1, p. 012079). IOP Publishing. <https://www.proquest.com/openview/cb6f80802e6f02b95ad33caa7e329a72/1?pq-origsite=gscholar&cbl=4998669>
- Schofield, P. (2000). Gas production methods. *Farm animal metabolism and nutrition*, 209-232. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/abs/10.1079/9780851993782.0209>
- Sebastián Sáenz, N., Barragán, H. B., Rodríguez, H. G., Pérez, O. D. G., & López, A. C. (2023). Determinación de producción de gas *in vitro*, y contenido de energía metabolizable de alimentos para rumiantes incubados con excretas de ovinos. *Latin American Archives of Animal Production*, 31(Suplemento), 191-196. https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/3169
- Sharifi, M., Taghizadeh, A. A., Khadem, A., Hosseinkhani, G., & Mohammadzadeh, H. (2019). "Efectos de la suplementación con nitratos y el nivel de forraje sobre la producción de gas, el equilibrio de nitrógeno y la degradación de la materia seca en ovejas". *Ciencia de la producción animal*, 59 (3), 515. <http://dx.doi.org/10.1071/an17759>
- Sobalvarro, J.L., Salazar, J. A. E., & Bourillón, A. R. (2020). La producción de gas *in vitro* para estimar la energía neta de lactancia: Producción de gas *in vitro* y energía neta de lactancia. *Agronomía Mesoamericana*, 311-328. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v31n2/2215-3608-am-31-02-00311.pdf>
- Sucu, E. (2020). Effects of microalgae species on *in vitro* rumen fermentation pattern and methane production. *Annals of Animal Science*, 20(1), 207-218. <http://dx.doi.org/10.2478/aoas-2019-0061>
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3-4), 185-197. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0377840194901716>

- Van Gelder, A. H., Hetta, M., Rodrigues, M. A. M., De Boever, J. L., Den Hartigh, H., Rymer, C., ... & Cone, J. W. (2005). Ranking of *in vitro* fermentability of 20 feedstuffs with an automated gas production technique: Results of a ring test. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 243-253.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840105001902>
- Váradyová, Z., Baran, M., & Zelenák, I. (2005). Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 81-94.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840105001707>
- Wangui, J. C., Millner, J. P., Kenyon, P. R., Tozer, P. R., Morel, P. C., & Pain, S. J. (2022). *In vitro* Fermentation of Browseable Native Shrubs in New Zealand. *Plants*, 11(16), 2085.
<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/16/2085>
- Wilkins, J. R. (1974). Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Applied Microbiology*, 27(1), 135-140.
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/am.27.1.135-140.1974>
- Zheng, C., Ma, J., Liu, T., Wei, B., & Yang, H. (2019). Effects of mannan oligosaccharides on gas emission, protein and energy utilization, and fasting metabolism in sheep. *Animals*, 9(10), 741. <https://www.mdpi.com/2076-2615/9/10/741>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: SM, EE, DP, RP; análisis e interpretación de los datos: SM, EE, DP, ML; redacción del artículo: SM, EE, DP, RP.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.