

Efecto de la lisozima sobre la emisión *in vitro* de CO₂ y pérdidas energéticas de CH₄ en bovinos

Effect of lysozyme on *in vitro* emission of CO₂ and energy loss of CH₄ in bovine

María Gabriela Rodríguez Arenillos¹, Pablo Gregorio Pizzani Corrales¹, Giovanna De Martino¹, Luis Edgardo Ojeda Ojeda², Raymer Adela Ramírez Portillo¹, Nirza de la Cruz Noguera-Machado²,

¹Universidad Rómulo Gallegos, Área de Agronomía, Instituto para el Desarrollo Sostenible de los Sistemas Agroambientales (IDESSA). Apartado 4563, San Juan de los Morros, estado Guárico, Venezuela.

²Universidad de Carabobo, Sección de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC). Apartado 2351, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Correspondencia: pablopizzanic@gmail.com

Rec.:02.03.2022 Acept.: 22.05.2022

Publicado el 30 de junio de 2022

Resumen

Se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de Clorhidrato de Lisozima (CL) sobre la emisión *in vitro* de CO₂ y las pérdidas energéticas asociadas al metano entérico, en sustrato fibroso con alimento concentrado (Conc.). Se estudiaron tres tratamientos: TC1: pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) lignificado, TC2: Concentrado 18 % PC y TC3: 75% pasto + 25% concentrado), cada uno a tres dosis (80000; 160000 y 320000 UI/kg). Distribuidos en: T1: Pasto, T^{1/80}: Pasto+CL80000, T^{1/160}: Pasto+CL160000, T^{1/320}: Pasto+CL320000, T2: Conc., T^{2/80}: Conc.+CL80000, T^{2/160}: Conc.+CL160000, T^{2/320}: Conc.+CL320000, T3: Pasto+Conc. T^{3/80}: Pasto+Conc.+CL80000, T^{3/160}: Pasto+Conc.+CL160000, T^{3/320}: Pasto+Conc.+CL320000. Los tiempos de incubación fueron: 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Los resultados indican que la adición de CL entre 80000 y 160000 UI/kg, aumentó (P<0.05) la degradación de la MS del pasto y TC3. La incorporación de 160000 UI/kg en T^{3/160} redujo en 72% la emisión de CO₂. El mayor valor de producción de CO₂ (472 ppm), lo registró T^{1/160} con 160000 UI/Kg CL. Los tratamientos que contenían CL (T^{3/80}, T^{3/160}, T^{3/320}) redujeron (P<0.05) la producción de CO₂ (443 ppm) con respecto al control (1710 ppm). El pasto con CL a diferentes dosis, redujo (P<0.05) las pérdidas energéticas asociadas a la producción de metano en 10.74% (80000 UI/kg) y 14.72% (160000 y 320000 UI/kg). En conclusión, el uso de Lisozima mejoró la tasa de utilización *in vitro* de la dieta (75% pasto + 25% concentrado) y redujo las emisiones de CO₂ y las pérdidas energéticas asociadas con las emisiones CH₄.

Palabras clave: Clorhidrato de Lisozima, bovinos, pérdidas energéticas, efecto invernadero, metanogénesis.

Abstract

The effect of increasing concentrations of Lysozyme chlorhydrate (LC) on *in vitro* CO₂ emission and energy losses associated with enteric methane in fibrous substrate with concentrated feed (Conc.) was evaluated. Three treatments were studied: TC1: lignified guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.), TC2: Concentrated 18 % PC and TC3: 75% grass + 25% concentrated) each at three doses (80,000; 160,000 and 320,000 IU/kg). Distributed in: T1: Pasture, T^{1/80}: Pasture+LC80000, T^{1/160}: Pasture+LC160000, T^{1/320}: Pasture+LC320000, T2: Conc., T^{2/80}: Conc.+LC80000, T^{2/160}: Conc.+LC160000, T^{2/320}: Conc.+LC320000, T3: Grass+Conc. T^{3/80}: Grass+Conc.+LC80000, T^{3/160}: Grass+Conc.+LC160000, T^{3/320}: Grass+Conc.+LC320000. The incubation times were: 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours. The results indicate that the addition of LC between 80000 and 160000 IU/kg increased (P<0.05) the degradation of grass DM and TC3. The incorporation of 160000 IU/kg in T^{3/160} reduced CO₂ emissions by 72%. The highest CO₂ production value (472 ppm) was recorded by T^{1/160} with 160000 IU/Kg CL. The treatments containing CL (T^{3/80}, T^{3/160}, T^{3/320}) reduced (P<0.05) the production of CO₂ (443 ppm) with respect to the control (1710 ppm). Grass with LC at different doses reduced (P<0.05) energy losses associated with methane production by 10.74% (80000 IU/kg) and 14.72% (160000 and 320000 IU/kg). In conclusion, the use of Lysozyme improved the *in vitro* utilization rate of the diet (75% grass + 25% concentrate) and reduced CO₂ emissions and energy losses associated with CH₄ emissions.

Keywords: Lysozyme chlorhydrate, cattle, energy losses, greenhouse effect, methanogenesis.

Introducción

Cada vez existe más preocupación en el impacto de la producción ganadera sobre el medio ambiente. El metano (CH₄), es un gas de efecto invernadero que permanece en la atmósfera aproximadamente 9 a 15 años, es 25 veces más efectivo para atrapar el calor en la atmósfera que el dióxido de carbono (CO₂) (Knox *et al.*, 2015). En los rumiantes, el CH₄ y el CO₂ se generan por acción de la fermentación microbiana de los carbohidratos y, en menor medida, de los aminoácidos, tanto en el retículo-rumen como en el intestino grueso de los animales, pero en el caso de los rumiantes la mayor producción ocurre en el primer compartimento (Pezo *et al.*, 2019). Como las condiciones en el rumen son anaeróbicas, una buena parte del CH₄ se produce a partir del CO₂, pero también hay alguna producción a partir de los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico) generados en el proceso de fermentación. Aproximadamente el 95.5% de la generación de CH₄ en los rumiantes se produce por fermentación del alimento en el rumen (AGO, 2003), lo que causa una pérdida de 2.3 a 10.8% de energía de los alimentos consumidos, dependiendo de la dieta y el animal (Guyader *et al.*, 2014). Por lo tanto, los inventarios nacionales de emisiones de gases de efecto invernadero son esenciales para la cuantificación de estas emisiones de países individuales y la elaboración de estrategias de mitigación a nivel de cada país (Fournel *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a la complejidad en la determinación de CH₄ *in vivo*, las ecuaciones de predicción son esenciales para estimar la concentración de CH₄ y el gasto energético en su síntesis a partir de los procesos de fermentación entérica de los sustratos alimenticios (Zhao *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2019). El cambio climático y el creciente énfasis en la metanogénesis derivada del rumen han dirigido considerables esfuerzos de investigación para la supresión de los microorganismos ruminales debido a su estrecha asociación con los metanógenos (Newbold *et al.*, 2015). Al disminuir la metanogénesis en el rumen, los equivalentes reductores pueden dirigirse al propionato (el principal precursor gluconeogénico en rumiantes) en lugar de ser eructado. Estas estrategias de inhibición de la metanogénesis son complicadas porque no se ha encontrado que los resultados sean duraderos y las concentraciones reducidas de microorganismos ruminales no siempre están correlacionadas con la producción reducida de metano (Williams *et al.*, 2009). La reducción de las emisiones globales de metano es una parte importante de cualquier esfuerzo para atenuar las emisiones antropogénicas de GEI. Sin embargo, la reducción del número de rumiantes no parece ser una opción debido a la creciente demanda mundial de carne

y leche, las cuales se verán duplicadas para el año 2050 (FAO, 2008). Es por ello, que la manipulación de las dietas a través de la adición de Clorhidrato de Lisozima, el cual puede reducir la concentración entérica de CH₄, lo hace promisorio para ser utilizado como inhibidor de la metanogénesis (Mamuad *et al.*, 2014; Biswas *et al.*, 2016). Otras estrategias serían: la incorporación de lípidos poliinsaturados (Martin *et al.*, 2010; Pirondini *et al.*, 2015), uso de antibióticos ionóforos (McGinn *et al.*, 2004; Beauchemin y McGinn, 2006; Ye *et al.*, 2018), la evaluación filogenética de las bacterias metanogénicas (Bryce *et al.*, 2011), dietas ricas en almidón (Moss *et al.*, 2000), implementación de prácticas en el manejo de pasturas para mejorar su calidad, así, como también, prácticas agrosilvopastoriles, donde se incorporen leguminosas ricas en taninos y otras especies arbóreas en la alimentación de los rumiantes, todo esto podría contribuir en la reducción de las emisiones de GEI de origen entérico-ruminal (Ramírez *et al.*, 2012; Murgueitio *et al.*, 2015; Pezo 2017). La composición de la dieta consumida por los animales, las características nutricionales de cada uno de los componentes y las interacciones entre ellos son determinantes de los patrones de fermentación ruminal y por ende de la emisión de CH₄ (Makkar, 2016).

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del Clorhidrato de Lisozima sobre la emisión *in vitro* de CO₂ y las pérdidas energéticas endógenas asociadas al CH₄.

Materiales y métodos

Ubicación, recolección y preparación de muestras

El material vegetal usado fue un pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) de 90 días después del rebrote, recolectado en el municipio Mario Briceño Iragorry (N 10°17.226'; W 067°37.457', a una elevación de 478 msnm; Aragua -Venezuela). El pasto fue cortado, secado y almacenado hasta su posterior uso. Como control del proceso de digestión ruminal se usó un alimento concentrado. El análisis de fibra con sus fracciones del material vegetal se determinó usando la metodología propuesta por Van Soest *et al.* (1991). Para determinar la proteína cruda (PC) se utilizó el método de Kjeldhal (AOAC 960.52, 2005) y la ceniza (C), (AOAC 923.03, 2005).

Enzima

Se usó un clorhidrato de lisozima liofilizado aislado de huevo de gallina marca Sigma-Aldrich (L2879-5G), ≥ 35000 unidades/mg de proteínas.

Tratamientos

Se utilizaron tres tratamientos constituidos por

diferentes sustratos: T1: pasto Guinea de 90 días repicado a 1mm; T2: Concentrado (Conc.) para vacas lecheras con 18% de PC y su combinación; T3: (75% pasto + 25% Conc.) a tres dosis (80000, 160000 y 320000 UI/kg) de Clorhidrato de Lisozima (CL). Quedando distribuidos de la siguiente manera: T1: Pasto, T^{1/80}: Pasto+L80, T^{1/160}: Pasto+L160, T^{1/320}: Pasto+L320; T2: Conc., T^{2/80}: Conc.+L80, T^{2/160}: Conc.+L160, T^{2/320}: Conc.+L320; T3: Pasto+Conc. T^{3/80}: Pasto+Conc.+L80, T^{3/160}: Pasto+Conc.+L160, T^{3/320}: Pasto+Conc.+L320.

Producción de gas *in vitro*

La producción de gas *in vitro* fue determinada según la técnica descrita por Menke y Steingass (1988).

$$GB \text{ (ml / 200mg MS, 24 h)} = \frac{(V_{24} - V_0 - Gb_0) \times 200 \times (Fh + Fc) / 2}{W}$$

Dónde:

V₀ = Posición del pistón en la incubación inicial; V₂₄ = Posición del pistón 24 horas después de la incubación; Gb₀ = Producción de gas media con muestra del licor ruminal; Fh = Factor de corrección de la muestra estándar (44.16 / Gbh – Gbo); Fc = Factor de corrección del concentrado (62,6 / Gbc – Gbo); W = Peso de la muestra en g de materia seca.

Determinación de la concentración CO₂ y el pH

Se determinó usando un detector de dióxido de carbono marca Extech Instruments Corporation Company. El pH se determinó con un pHmetro digital marca BOECO, modelo PT 370 pH y mV.

Degradabilidad ruminal de la materia orgánica (DMO)

Para estimar el nivel de degradabilidad que sufrió el material vegetal durante el proceso de fermentación se empleó la ecuación propuesta por Menke y Steingass (1988).

$$\%DMO = 14.88 + 0.889(VG) + 0.45(PC) + 0.0651(C)$$

Dónde:

VG = Volumen de gas producido en las jeringas, PC = Proteína cruda, C = Porcentaje de cenizas

Estimación de la energía metabolizable (MJ/kg MS)

Para estimar la energía metabolizable, se utilizó

la ecuación propuesta por Menke y Steingass (1988), para ello se consideraron los valores obtenidos de la degradabilidad de la materia orgánica (DMO).

$$EM \text{ (MJ/kg MS)} = -1.15 + 0.1600 \text{ DMO}$$

Estimación de las pérdidas energéticas asociadas al metano entérico (MJ/kg MS)

En el cálculo de las pérdidas energéticas asociadas a la síntesis del metano entérico se utilizaron dos ecuaciones descritas en el trabajo de Zhao *et al.* (2016).

- CH₄ energía (MJ/d) = 0.26+0.064×ME (MJ/d)
- Porcentaje (%) de energía perdida por emisión de (CH₄) = CH₄ (MJ/d) * 100/EM (MJ/kg)

Dónde: ME se refiere la cantidad de energía metabolizable (presente en el sistema) expresada en MJ/d.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con tres replicas por tratamiento. Con arreglo factorial. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows (Visauta, 1998) y se usó la prueba de comparación de Duncan (P<0.05).

Resultados y discusión

Análisis bromatológico del sustrato pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.).

El pasto guinea fue recolectado después de 90 días del rebrote, secado y almacenado hasta su uso. Es un pasto con un alto contenido de lignina (16.03 %). El contenido de fibra expresado como FDN y FDA fue de 83.72 y 37.54 % respectivamente. El valor de la PC fue de 4.07 % (Cuadro 1).

Producción acumulada de gas durante la fermentación, degradabilidad de la MS y cinética de la producción de gases.

Los valores de producción acumulada de gas, degradabilidad de la materia seca y los parámetros cinéticos de producción de gases *in vitro* de los sustratos evaluados se presentan en el Cuadro 2. Los tratamientos con concentrado comercial para vacas lecheras con y sin Lisozima mostraron la mayor

Cuadro 1. Valores porcentuales de la composición estructural del pasto guinea (*P. maximum*).

Muestra	FDN	FDA	LIG.	CEL.	HEM.	CENIZA	PC
Pasto	83.72	37.54	16.03	21.87	46.18	10.43	4.07

FDN= Fibra neutro detergente, FDA= Fibra ácido detergente, LIG= Lignina, CEL= Celulosa, HEM= Hemicelulosa, PC= Proteína cruda

Cuadro 2. Producción acumulada de gas *in vitro*, degradabilidad de la MS, pérdidas energéticas asociadas al metano endógeno Producción acumulada de gas (mL/g MS)

Tratamientos	3	6	9	24	48	72	DMS (%)	EM (MJ/kgMS)	CH ₄ Energía (MJ/d) ^{1/}	CH ₄ Energía (%) ^{2/}	CO ₂ ppm
TC1 : Pasto SL	7.5 ^d	15.0 ^{de}	22.5 ^f	27.5 ^f	62.5 ^g	127.5 ^g	25	2.85	0.43	15.08 ^a	313 ^d
T ^{1/80} : Pasto	7.5 ^d	17.5 ^{de}	27.5 ^{de}	32.5 ^f	70.0 ^g	132.5 ^g	29	3.49	0.47	13.46 ^b	408 ^e
T ^{1/160} : Pasto	12.5 ^{bc}	30.0 ^c	42.5 ^d	52.5 ^d	100.0 ^{ef}	175.0 ^f	31	3.81	0.49	12.86 ^b	472 ^e
T ^{1/320} : Pasto	10.0 ^{bc}	22.5 ^d	32.5 ^{de}	42.5 ^{de}	90.0 ^{ef}	167.5 ^f	31	3.81	0.49	12.86 ^b	443 ^e
TC2 : Conc SL	15.0 ^b	42.5 ^b	120.0 ^a	192.5 ^a	397.5 ^a	620.0 ^a	65	9.25	0.82	8.86 ^c	1710 ^a
T ^{2/80} : Conc	27.5 ^a	65.0 ^a	132.5 ^a	195.0 ^a	370.0 ^{ab}	585.0 ^a	57	7.97	0.74	9.28 ^c	738 ^b
T ^{2/160} : Conc	10.0 ^{bc}	32.5 ^c	67.5 ^b	102.5 ^b	207.5 ^c	322.5 ^b	49	6.69	0.66	9.86 ^c	414 ^c
T ^{2/320} : Conc	15.0 ^b	45.0 ^b	115.0 ^a	182.5 ^a	370.0 ^{ab}	580.0 ^a	53	7.33	0.70	9.54 ^c	379 ^{cd}
TC3 : P+C SL	12.5 ^{bc}	27.5 ^c	52.5 ^{bc}	72.5 ^c	160.0 ^d	277.5 ^{cd}	49	6.69	0.66	9.86 ^c	278 ^c
T ^{3/80} : P+C	15.0 ^b	35.0 ^c	60.0 ^b	85.0 ^c	177.5 ^d	300.0 ^c	50	6.85	0.67	9.78 ^c	269 ^c
T ^{3/160} : P+C	15.0 ^b	32.5 ^c	55.0 ^{bc}	75.0 ^c	142.5 ^c	235.0 ^c	42	5.57	0.59	10.59 ^{cd}	199 ^c
T ^{3/320} : P+C	15.0 ^b	35.0 ^c	67.5 ^b	97.5 ^b	207.5 ^c	347.5 ^b	53	7.33	0.70	9.54 ^c	404 ^c
Promedio	13.55	33.35	66.25	96.45	196.25	322.5	44	5.97	0.61	10.96	502

T^{n/80}: 80000 UI/kg, T^{n/160}: 160000 UI/kg y T^{n/320}: 320000 UI/kg. ^{1/} CH₄ energía (MJ/d) = 0.26+0.064×MEI (MJ/d). Porcentaje (%) de energía perdida por emisión de (CH₄) = CH₄ (MJ/d) * 100/EM (MJ/kg). Superíndices no comunes difieren a P<0.05 (Duncan, 1955)

producción (P<0.05) potencial (a) *in vitro* de gas, en correspondencia con una alta tasa de fermentación (P<0.05). En contraste los tratamientos que contenían pasto con y sin Lisozima (SL, 80000, 160000, 320000 UI/kg) contienen una importante fracción no digerible en comparación con el resto de los tratamientos (Concentrado y Pasto+Concentrado: 80000, 160000, 320000 UI/kg de Lisozima).

La adición de clorhidrato de Lisozima en concentraciones crecientes, incrementó la tasa de degradación del pasto de baja calidad, los mayores incrementos de degradabilidad de la materia seca (%) se obtuvieron con concentraciones de 160000 y 320000 UI/kg de Lisozima. Un aumento de la digestibilidad e ingesta de forraje digestible reduce las emisiones de CH₄ por fermentación entérica (Afshar y Naser, 2011; Beltrán *et al.*, 2016). Contrario a esta aseveración pastos de baja calidad incrementan la producción de CH₄. Las mejoras en la degradabilidad de este pasto de baja calidad podrían estar influenciada por la adición de Lisozima, ya que esta tiene actividad enzimática sobre los procesos de digestión (Sahoo *et al.*, 2012). Por otro lado, el Clorhidrato de Lisozima, redujo la tasa de degradación del concentrado, los mayores valores de reducción de degradabilidad del concentrado se obtuvieron con 160000 y 320000 UI/kg de Lisozima. Esta reducción en la degradabilidad del concentrado podría estar relacionada con la sensibilidad de las bacterias amilolíticas (Gram positivas) al Clorhidrato

de Lisozima (Sahoo *et al.*, 2012). Sin embargo, al agregar 320000 UI/kg de Lisozima, se incrementó la tasa de degradación de una dieta clásica para vacas lecheras (75% pasto + 25% concentrado, Cuadro 2).

Producción de dióxido de carbono (CO₂) en presencia de Lisozima.

En el Cuadro 2 se presentan los contenidos de dióxido de carbono de los sustratos evaluados (pasto, concentrado y pasto + concentrado) en presencia de Lisozima. Mostraron un incremento en la producción de CO₂ en los tratamientos que contenían pasto (T^{1/80}, T^{1/160}, T^{1/320}) y pasto + Concentrado (T^{3/80}, T^{3/160}, T^{3/320}) con diferentes niveles de incorporación de Lisozima. El mayor valor de producción de CO₂ (472 ppm) en los sustratos que contenían pasto, lo registró el tratamiento T^{1/160} con 160000 UI/kg de Lisozima adicionado al medio de fermentación. Contrario a estos resultados, los tratamientos que solo contenían concentrado comercial para vacas lecheras con diferentes niveles de incorporación de Lisozima (T^{3/80}, T^{3/160}, T^{3/320}) redujeron en forma significativa (P<0.05) la producción de CO₂ con respecto al control (1710 ppm). Esto podría estar relacionado con el hecho de que la mayoría de las bacterias ruminales amilolíticas (*Succinomonas amylofilica*, *Butyrivibrio fi brisolvens*, *Butyrivibrio alactacidigens*, *Streptococcus bovis*, *Bacteroides amylophilus*) son Gram positivas, y en consecuencia altamente sensibles al Clorhidrato de

Lisozima (Biswas *et al.*, 2016). Sin embargo, este comportamiento fue muy puntual y se presentó solo en los tratamientos 100% con concentrado. De igual forma Biswas *et al.* (2016) encontraron una disminución en las concentraciones de metano con un aumento de la inclusión de Lisozima. Además, Mamuad *et al.* (2014) reportaron una correlación negativa entre la cantidad de Lisozima adicionada y la concentración de CH₄.

En el tratamiento T3 (forraje +concentrado) no se observó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en la producción de CO₂ con respecto al control para las dosis de 80000 y 160000 UI/kg de Lisozima. Solo se presentó un incremento de 146% en la producción de CO₂ para la mayor dosis (320000 UI/kg) de Clorhidrato de Lisozima en las tres dosis del tratamiento T3 (T^{3/80}, T^{3/160}, T^{3/320}).

Se puede inferir que la energía producto de la disminución de la generación de CO₂ al adicionar Clorhidrato de Lisozima, se destinaria a la síntesis de propionato que finalmente contribuiría al incremento de la producción de leche. En tal sentido, Nyachoti *et al.* (2012) señalaron una tendencia a aumentar el propionato en lechones, cuando se añadieron 0.1 y 0.2% de Lisozima a la dieta basal experimental. Cuando se adiciona Lisozima a un sustrato alto en concentrado (carbohidratos solubles) puede producir propionato debido a la utilización de hidrógeno (H₂). Por otra parte, las bacterias metanogénicas generan CH₄ a partir de CO₂ e H₂ (Corrales *et al.*, 2015). La Lisozima facilita la utilización de H₂ convirtiéndose en un competidor de los metanógenos. En última instancia, la Lisozima inhibe la producción de CH₄. La cual está altamente correlacionada con la concentración de CO₂ potencialmente reducible a CH₄ en un ambiente rico en H₂ como el rumen. Sin embargo, es importante realizar experimentos *in vivo* para llegar a conclusiones sólidas. Otros autores (Van Soest, 1991; Johnson *et al.*, 1994; Johnson y Johnson, 1995; McGinn *et al.*, 2004; Beauchemin y McGinn, 2006), señalan que el uso de antibióticos ionóforos, como la monensina, la rumensina o el lasolacid, reducen el consumo de alimento, la concentración de flora Gram positiva, la relación acético:propiónico, la formación de hidrógeno y la de metano (hasta un 25%). Sin embargo, el uso de este tipo de aditivos actualmente, no se encuentra autorizado en varios países.

Es importante destacar que el metano que se genera por la fermentación ruminal del alimento y los excedentes de hidrógeno (H₂) producidos son usados por las bacterias metanogénicas para la reducción del CO₂ a CH₄, el cual es emitido mediante los eructos (Beltrán *et al.*, 2016). Las dietas ricas en carbohidratos solubles contienen altas concentraciones de almidón que favorece la producción de propionato y la cual

disminuye la relación metano/materia orgánica fermentada en el rumen. El efecto de estas dietas sobre el pH ruminal puede explicar la disminución en las emisiones de metano (Moss *et al.*, 2000). En esta investigación *in vitro* no hubo diferencias en el pH para ninguno de los tratamientos (6.8 – 6.9) ya que se utilizó una solución amortiguadora y un ambiente cerrado.

Las pérdidas energéticas *in vitro* debido a la producción de metano para el pasto Guinea fue de 15.08% (Cuadro 2). Similares resultados señalan Montenegro y Abarca (2000), quienes indican que al alimentar bovinos con forrajes de baja calidad nutritiva, la producción de metano se ubica entre el 15 y 18% de la energía digestible. La producción de CH₄ en los bovinos representa entre 2 y 12% de la energía del alimento (Johnson y Johnson, 1995). Otros autores (Anderson y Rasmussen, 1998; Kurihara *et al.*, 1999; Weimer, 1998) señalan que las pérdidas energéticas debido a la producción de metano en los bovinos normalmente representan entre 5.5-6.5% del total de la energía potencial consumida en la dieta, sin embargo, valores entre 2-12% se reportan en condiciones de pastoreo en zonas templadas. Cuando al pasto bajo estudio se le adicionó el Clorhidrato de Lisozima a diferentes dosis, hubo una reducción ($P < 0.05$) en la pérdida de energía asociada a la producción de metano de 10.74% (80000 UI/kg), 14.72% (160000 y 320000 UI/kg) para las diferentes dosis. El tratamiento T3 con las diferentes dosis de Lisozima (T^{3/80}, T^{3/160}, T^{3/320}), no presentó diferencias en la producción de CO₂.

Conclusión

La adición de Clorhidrato de Lisozima incrementó la tasa de degradación de la materia con las diferentes dosis de Lisozima seca de un pasto de baja calidad, redujo la tasa de producción de dióxido de carbono *in vitro* en los tratamientos ricos en carbohidratos solubles y disminuyó las pérdidas energéticas asociadas a la producción de metano.

Literatura citada

- AGO. National greenhouse gas inventory. 2001 with methodology supplements (2003) Canberra, Australia.
- AOAC (2005) Official methods of analysis. 18th Ed. Association of Official Agricultural Chemistry. Washington, D.C. USA. 1250 -1255 pp.
- Afshar, M. y Naser, M. 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants: feeding strategies. Journal Asian of Animal Veterinary Advance. 6(9):888-908.
- Anderson RC and Rasmussen MA. Use of a novel

- nitrotoxinmetabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technology*. 1998; 64: 89-95
- Biswas, A., Lee, S., Mamuad, L., Kim, S., Choi, Y., Bae, G., Lee, K., Sung, H., y Lee, S. 2016. Use of lysozyme as a feed additive on *in vitro* rumen fermentation and methane emission. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(11), 1601–1607.
- Beauchemin, K. y McGinn, S. 2006. Efectos de varios aditivos alimenticios sobre las emisiones de metano del ganado vacuno. *International Congress Series 1293*, 152-155.
- Beltrán, M.; Álvarez, G.; Pinos, J. & Contreras, C. 2016. Methane emission from dairy cattle production systems in San Luis Potosí Valley, Mexico. *Agrociencia*. 50(3): 297-305.
- Bryce, B.; Denis, M.; Attwood, G.; Altermann, E.; Janssen, P.; Ronimus, R.; Cesar S. Pinares-Patiño, C., Muetzel, S. y Neil Wedlock N. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188(1): 11-17.
- Corrales, L.; Romero, D.; Macías, J. y Vargas, A. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*. 13 (23): 55-81
- Fournel, S.; Ouellet, V. y Charbonneau, É. 2017. Practices for alleviating heat stress of dairy cows in humid continental climates: a literature review. *Animals*. 7(5):37.
- Guyader, J.; Eugène, M.; Noziere, P.; Morgavi, D.P.; Doreau, M. y Martin, C. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal*. 8(11):1816-25.
- Johnson, D. y Ward, G. 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*. 42(1):133–141.
- Johnson, K. y Johnson, D. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73(8):2483–2492.
- Johnson, K.; Huyler, M.; Westberg, H.; Lamb, B. y Zimmerman, P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. *Environmental Science & Technology*. 28:359-362.
- Knox, S.; Sturtevant, C.; Matthes, J.H.; Koteen, L.; Verfaillie, J. y Baldocchi, D. 2015. Agricultural peatland restoration: effects of land- use change on greenhouse gas (CO₂ and CH₄) fluxes in the Sacramento-San Joaquin Delta. *Global Change Biology*. 21:750-65.
- Kurihara, M.; Magner, T.; McCrabb, H. & McCrabb, G. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition*. 81: 227-234.
- Martin, C.; Morgavi, D. y Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4(3):351-365
- Mamuad, L.; Kim, S.; Jeong, C.; Choi, Y.; Jeon, C. y Lee, S. 2014. Effect of fumarate reducing bacteria on *in vitro* rumen fermentation, methane mitigation and microbial diversity. *Journal of Microbiology*. 52:120-128.
- Makkar, H. 2016. Smart livestock feeding strategies for harvesting triple gain—the desired outcomes in planet, people and profit dimensions: a developing country perspective. *Animal Production Science*. 56(3):519-534
- McGinn, S.; Beauchemin, K.; Coates, T.; y Colombatto, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*. 82(11): 3346-3356.
- Menke K. y H. Steingass. 1988. Estimation of the energy etic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal research and development*. 28: 7-55.
- Montenegro, J. y Abarca, monteS. 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: *Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales*. CATIE – FAO – SIDE. Ed. Nuestra Tierra. 334 p.
- Moss, A.; Jouany, J. y Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *INRA EDP Sciences. Annales de zootechnie*. 49(3): 231-253.
- Murgueitio, E; Barahona, R; Chará, J; Flores, M; Mauricio, R; y Molina, J. 2015. The intensive silvopastoral systems in Latin America sustainable alternative to face climatic change in animal husbandry. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 49(4):541-554.
- Newbold, C.; De la Fuente, G.; Belanche, A.; Ramos-Morales, E. y McEwan, N. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontier of Microbiology*. 6(1):1-14.
- Nyachoti, C.; Kiarie, E.; Bhandari, S.; Zhang, G. & Krause, D. 2012. Weaned pig responses to *Escherichia coli* K88 oral challenge when receiving a lysozyme supplement. *Journal of Animal Science*. 90(1):252-260.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2008. *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo*. ISBN 978-92-5-306049-8. Roma, Italia.

- Pezo, D. 2017. Tecnologías forrajeras para la intensificación de la ganadería en el contexto del cambio climático. Revista UTN (Costa Rica) 78:18-25.
- Pezo, D. 2019. Intensificación sostenible de los sistemas ganaderos frente al cambio climático en América Latina y el Caribe: Estado del Arte. Banco Interamericano de Desarrollo. Monografía. 685 p.
- Pirondini, M.; Colombini, S.; Mele, M.; Malagutti, L.; Rapetti, L.; Galassi, G. y Crovetto G. 2015. Effect of dietary starch concentration and fish oil supplementation on milk yield and composition, diet digestibility, and methane emissions in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 98(1):357-372.
- Ramírez, R.; Pizzani, P.; De Martino, G.; García, D.; Linares, Z. y Colmenares, O. 2012. Estimación *in vitro* de gases con efecto invernadero en frutos y follaje de árboles de un bosque seco tropical de Venezuela. Pastos y Forrajes, 35(1):99-108
- Sahoo, N.; Kumar, P.; Bhusan, B.; Bhattacharya, T.K.; Dayal, S. y Sahoo M. 2012. Lysozyme in livestock: a guide to selection for disease resistance: a Review. Journal of Animal Science Advances. 2(4):347-360.
- Tao, M.; Kaidong, D. y Qiyu, D. 2019. Prediction of methane emission from sheep based on data measured *in vivo* from open-circuit respiratory studies. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 32(9): 1389-1396.
- Ye, D. 2018. Essential oil and monensin affect ruminal fermentation and the protozoal population in continuous culture. Journal of Dairy Science. 101(6): 5069-5081.
- Van Soest, P.; Robertson, J. y Lewis, B. 1991. Symposium: Carbohydrate, methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle, Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74(10):3583-3597.
- Weimer, P. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. Journal of Animal Science. 76(12): 3114 – 3122.
- Williams, Y.; Popovski, S.; Rea, S.; Skillman, L.; Toovey, A.; Northwood, K. y Wright, A. 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. Applied Environmental Microbiology. 75(7):1860–1866.
- Zhao, Y.; O'Connell, N. y Yan, T. 2016. Prediction of enteric methane emissions from sheep offered fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using data measured in indirect open-circuit respiration chambers. Journal of Animal Science. 94(6):2425-2435.