



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EMISIÓN DE METANO POR EFECTO DEL TIPO DE DIETAS PARA CONEJOS
EN FINALIZACIÓN: ESTUDIO *IN VITRO***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

ALEJANDRA VANESSA SILVA GONZÁLEZ

ASESOR

Dr. PEDRO ABEL HERNÁNDEZ GARCÍA

COASESOR

Dr. CESAR DÍAZ GALVÁN

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE 2023

INDICE GENERAL

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Metano y su efecto en el cambio climático.....	3
2.2 Sector ganadero y agrícola en la contribución a las emisiones de gases de efecto invernadero	4
2.3 El conejo y su contribución en la generación de gases de efecto invernadero	5
2.4 Población de conejos a nivel mundial	8
2.5 Producción nacional de conejos.....	9
2.6 Beneficios de la carne de conejo	10
2.7 Tracto gastrointestinal del conejo.....	12
<i>Estómago</i>	13
<i>Intestino delgado</i>	14
<i>Intestino grueso</i>	15
<i>Ciego</i>	17
<i>Cecotrofia</i>	19
2.8 Alimentación y nutrición	20
<i>Proteínas</i>	21
<i>Carbohidratos</i>	21
<i>Lípidos</i>	22
<i>Vitaminas y minerales</i>	23
2.9 Forrajes.....	25

3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
4	OBJETIVOS.....	29
4.1	General	29
4.2	Específicos.....	29
5	HIPÓTESIS.....	30
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1	Inóculo e incubaciones <i>in vitro</i>	31
6.2	Determinación de ácidos grasos volátiles	32
6.3	Diseño experimental.....	33
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8	CONCLUSIÓN.....	37
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de emisión de metano por gestión del estiércol para ciervos, renos, conejos y pelíferos	6
Cuadro 2. Composición química y valor energético de distintos tipos de carne	10
Cuadro 3. Composición de ácidos grasos y contenido de colesterol de distintos tipos de carne.....	11
Cuadro 4. Recomendaciones de proteína y aminoácidos para conejos en crecimiento y lactantes.....	22
Cuadro 5. Requerimientos recomendados en la alimentación de conejos en diferentes etapas fisiológicas	24
Cuadro 6. Ingredientes y composición nutricional de dieta para conejos	32
Cuadro 7. Efecto del tipo de dieta para conejos en producción de metano y parámetros de fermentación.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emisiones antropogénicas de GEI por continente	5
Figura 2. Sistematización de géneros de metanógenos detectados en no rumiantes.....	7
Figura 3. Producción de conejos a nivel mundial	8
Figura 4. Número de cabezas de conejos en México del año 2012-2021	9
Figura 5. Esquema de la anatomía del tracto digestivo del conejo	13
Figura 6. Disección del intestino grueso del conejo.	16
Figura 7. Proceso de formación de cecotrofos	19
Figura 8. Ingestión de cecotrofos.	20
Figura 9. Digestión de la fibra en conejos	27

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de una dieta formulada en comparación a una dieta comercial para conejos en la mitigación de metano bajo condiciones de producción de gas *in vitro*. El estudio se realizó en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Amecameca (Posta Zootécnica y Laboratorio Multidisciplinario de Investigación) de la Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, Estado de México. Se empleo inóculo ruminal para el estudio *in vitro* colectado prepanchal de un bovino donador Holstein fistulado en rumen, se emplearon frascos ámbar con una capacidad de 120 ml a los cuales se les adiciono como sustrato 500 mg de cada uno de los alimentos a evaluar molidos a un tamaño de partícula de 1 mm agregando a cada frasco 90 ml de líquido ruminal estandarizado con un flujo constante de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se estimó la emisión de CH₄ y CO₂ mediante el empleo de una jeringa de vidrio graduada volumétricamente la cual contenía el gas producido durante la fermentación y transferido a una solución con hidróxido de sodio para la cuantificación de gases. Se determinó la concentración de AGV mediante la técnica de cromatografía de gases en muestras preparadas con ácido metafosfórico (25 % p/v) en una relación 4:1. Respecto a la producción de CH₄ y CO₂ se observó una disminución en CH₄ (P=0.0108) con la dieta comercial Purina en comparación a los demás alimentos comerciales y con la dieta formulada, por su parte la producción de ácidos grasos volátiles no se presentaron diferencias significativas (P>0.05) entre tratamientos destacando mayor producción de AGV totales con la dieta comercial Purina y Malta (P=0.0132). Por lo cual se concluye que la dieta comercial Purina evaluada en este estudio *in vitro* fue la que mostró menor producción de CH₄, así como mayor concentración de AGV totales respecto a los demás tratamientos.

Palabras clave: gases de efecto invernadero, metano, *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of a formulated diet compared to a commercial diet for rabbits on methane mitigation under *in vitro* gas production conditions. The study was carried out at the facilities of the UAEM Amecameca University Center (Zootechnical Posta and Multidisciplinary Research Laboratory) of the Autonomous University of the State of Mexico, Amecameca, State of Mexico. Ruminant inoculum was used for the *in vitro* study, collected prepancreally from a Holstein donor cattle fistulated in the rumen. Amber bottles with a capacity of 120 ml were used to which 500 mg of each of the foods to be evaluated were added as substrate, ground to a particle size of 1 mm, adding 90 ml of ruminal liquid standardized with a constant flow of CO₂ to each bottle. After the incubation time, CH₄ and CO₂ emissions were estimated using a volumetrically graduated glass syringe containing the gas produced during fermentation and transferred to a sodium hydroxide solution for gas quantification. The concentration of VFA was determined by gas chromatography in samples prepared with metaphosphoric acid (25 % w/v) in a 4:1 ratio. Regarding the production of CH₄ and CO₂, a decrease in CH₄ (P=0.0108) was observed with the Purina commercial diet compared to the other commercial feeds and the formulated diet, while the production of volatile fatty acids did not show significant differences (P>0.05) between treatments, highlighting a higher production of total VFA with the Purina and Malta commercial diet (P=0.0132). Therefore, it is concluded that the Purina commercial diet evaluated in this *in vitro* study was the one that showed the lowest CH₄ production, as well as the highest concentration of total VFA compared to the other treatments.

Key words: greenhouse gases, methane, *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

El sector ganadero desempeña un papel crucial en la contribución a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), tal como, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O). Debido al rápido crecimiento de la población mundial, la demanda de alimentos se incrementa, especialmente la de productos con alto contenido en nutrientes, como la leche y la carne, cuyo consumo se espera se duplique en 2050 en comparación con el año 2000 (Steinfeld, 2006). En este tenor, la cunicultura, proporciona carne con excelentes características nutricionales específicas, como su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y aminoácidos esenciales; al mismo tiempo, sus valores energéticos moderadamente altos, bajo contenido en grasa y niveles de colesterol contribuyen a su composición deseable (Dalle Zotte y Szendrő, 2011), siendo estas propiedades nutricionales aptas por parte de los consumidores por llevar un estilo de vida saludable.

Dentro de las cualidades del conejo destacan que es un herbívoro fermentador del intestino posterior; su fisiología digestiva le permite obtener proteínas y vitaminas a través de la cecotofía, la cual resulta ser una estrategia altamente eficiente para incrementar el aprovechamiento de la proteína dietética de baja calidad reciclándose vía fermentación en el ciego junto a las secreciones proteicas endógenas y las células epiteliales desprendidas del intestino delgado (Carabano, 1998). Aunado a esto, presenta un ciclo vital corto, un periodo de gestación breve, una alta prolificidad, así como una buena capacidad de conversión alimenticia (Lebas *et al.*, 1997).

El uso de forrajes o fibras en la alimentación animal ha llevado a la realización de investigaciones enfocadas en el estudio de arqueas metanogénicas ruminales, recientemente existen reportes de estos mismos géneros de microorganismos presentes en animales no rumiantes con una gran similitud, las cuales aún no han sido asignadas a una unidad taxonómica estricta. Tales arqueas se han observado en cerdos (Mao *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Mi *et al.*, 2019), caballos (Lwin y Matsui, 2014), conejos (Kušar y Avguštin, 2010) y aves de corral (Saengkerdsud *et al.*, 2007), lo cual indica que no únicamente los rumiantes son generadores de metano,

sino que los animales no rumiantes contribuyen en menor medida, por lo que se ha evaluado el efecto del manejo, nutrición y genética de los conejos, sin embargo, se desconoce con exactitud el impacto de estos animales en la contaminación medioambiental, la principal hipótesis sobre la producción de conejos es una contribución significativa a las emisiones de gases de efecto invernadero en comparación al ganado rumiante (Tonhauzer *et al.*, 2023).

2. ANTECEDENTES

2.1 Metano y su efecto en el cambio climático

El cambio climático es el mayor desafío de la historia moderna; el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) inducidas por el hombre altera el equilibrio energético de la tierra provocando un aumento de la temperatura global, según distintos escenarios de emisiones publicados oscila entre menos de 1.5°C y 5°C para 2100 (IPCC, 2006; Tonhauzer *et al.*, 2023). Aproximadamente el 14.5% de las emisiones antropogénicas mundiales de GEI se deben a actividades relacionadas con la ganadería (Gerber *et al.*, 2013), cuantificar y mitigar el impacto medioambiental del sector ganadero es de interés mundial, ya que desempeña un papel importante en el cambio climático (Cesari *et al.*, 2018; Biagini *et al.*, 2021). Sin embargo, diferentes estudios reportan que el principal contribuyente a los impactos ambientales es la producción de alimentos, en particular, los insumos o ingredientes proteicos comprados, especialmente la harina de soya, que está asociada a las emisiones relacionadas con la deforestación (Bava *et al.*, 2017; Cesari *et al.*, 2018). Los sistemas ganaderos generan grandes cantidades de estiércol en todo el mundo (Thangarajan *et al.*, 2013) e incluyen un contenido global de N estimado en 81.5-128.3 gT/año⁻¹ (MacDonald *et al.*, 2011).

El metano se produce durante la fermentación de los alimentos en el tracto gastrointestinal (TGI) por arqueas metanogénicas conocidas como metanógenos, estos son un grupo especializado de microorganismos pertenecientes al filo *Euryarchaeota* (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018), forman parte de un microbioma que ha evolucionado en profunda asociación simbiótica con los animales. Las arqueas metanogénicas pertenecen a los órdenes *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanococcales*, *Methanocellales* y *Methanopyrales* (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018), siendo las más prevalentes en animales del género *Methanobrevibacter* (Luo *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2017; Moissl-Eichinger *et al.*, 2018).

2.2 Sector ganadero y agrícola en la contribución a las emisiones de gases de efecto invernadero

Los rumiantes producen metano por unidad de alimento consumido (EPA, 2000), aunado a los efectos nocivos sobre calentamiento global, el CH₄ es también una pérdida de energía alimentaria, los rumiantes pueden perder entre el 2 y 12 % de la energía ingerida en forma de CH₄ (Johnson y Ward, 1996). Los distintos tipos de alimentos tienen un efecto significativo sobre las emisiones entéricas, en particular CH₄, por lo que los sistemas de nutrición, alimentación y las raciones tienen el mayor potencial para reducir las emisiones de CH₄ (Knapp *et al.*, 2014).

El sector agrícola contribuye al cambio climático mediante la emisión de gases de efecto invernadero (Figura 1), procedentes de la producción ganadera, especialmente de rumiantes; por ejemplo, las emisiones de CH₄ procedentes de la fermentación entérica, la gestión del estiércol y las emisiones de N₂O procedentes de la gestión del estiércol (Koonawootrittriron y Elzo, 2010).

Según la Agencia de Protección Medioambiental (EPA), el sector agrícola emite alrededor del 10 - 12 % del total de las emisiones antropogénicas mundiales de GEI, en las emisiones globales, el 44 % del CH₄ y el 13 % del CO₂ son producidos por actividades antropogénicas, respectivamente (Gavrilova *et al.*, 2019).

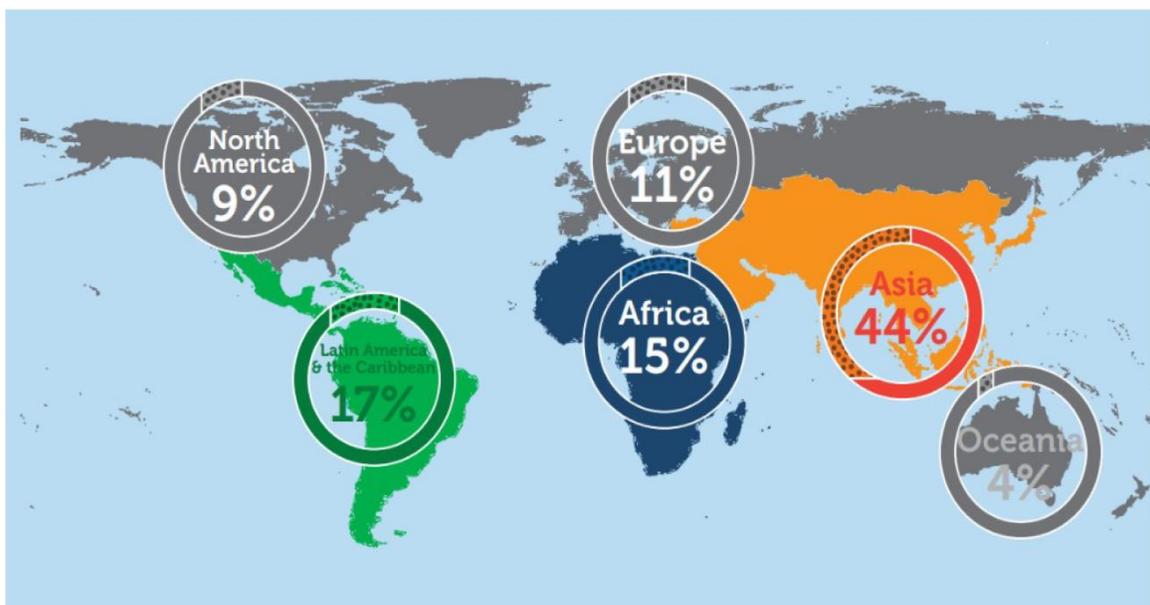


Figura 1. Emisiones antropogénicas de GEI por continente

Tomado de Faostat, (2016)

2.3 El conejo y su contribución en la generación de gases de efecto invernadero

La población de animales que se mantienen en condiciones domésticas y que no son controlados estadísticamente, tales como la población de gatos, perros y otros animales de peletería, entre ellos los conejos, que no se realiza una recopilación oficial y no son controlados sistemáticamente, son contribuyentes en menores cantidades en comparación al ganado rumiante de gases de efecto invernadero. Investigaciones realizadas han evaluado el efecto del manejo, nutrición y genética de los conejos, sin embargo, se desconoce con exactitud el impacto de estos animales en la contaminación medioambiental. La principal hipótesis sobre la crianza de conejos es una contribución significativa a las emisiones de gases de efecto invernadero (Tonhauzer *et al.*, 2023), así mismo Por su parte Clauss *et al.* (2020) han presentado una revisión de las emisiones de CH₄ en diferentes mamíferos, estipulando que todos los mamíferos suelen producir algunas cantidades de CH₄, y que la intensidad de las emisiones de este gas de algunos no

rumiantes sigue siendo comparable a la de los rumiantes. Sin embargo, no se sabe a ciencia cierta qué factores y sus parámetros determinan el nivel de producción de CH₄ en las distintas especies animales.

Datos oficiales emitidos por el IPCC (2006), menciona que los conejos son contribuyentes en la emisión de metano a través de la gestión del estiércol, con una producción anual de 0.08 Kg de CH₄ por cabeza⁻¹ año⁻¹, representando el factor de emisión más bajo en comparación a ciervos, renos, zorros y visones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores de emisión de metano por gestión del estiércol para ciervos, renos, conejos y pelíferos

Ganado	Factor de emisión de CH₄ (kg CH₄ cabeza⁻¹ año⁻¹)
Ciervos	0.22
Renos	0.36
Conejos	0.08
Pelíferos (zorros, visones)	0.68

Adaptado de IPCC, (2006)

Investigaciones enfocadas en arqueas metanogénicas en rumiantes han demostrado la presencia de arqueas no cultivadas y desconocidas con grandes similitudes con especies conocidas las cuales aún no han sido asignadas a una unidad taxonómica estricta. Tales arqueas (Figura 2) se han observado en cerdos (Mao *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012; Mi *et al.*, 2019), caballos (Lwin y Matsui, 2014), conejos (Kušar y Avguštin, 2010) y aves de corral (Saengkerdsub *et al.*, 2007).

Además, la abundancia de metanógenos se cree que su diversidad y composición afectan a la producción de CH₄ tal es el caso de los conejos, en donde la disminución del tamaño de las partículas de fibra reduce la diversidad de metanógenos, aumentando la abundancia de *Methanobrevibacter* a expensas de *Methanosphaera*, lo que probablemente de como resultado una mayor emisión de CH₄ (Liu *et al.*, 2018).

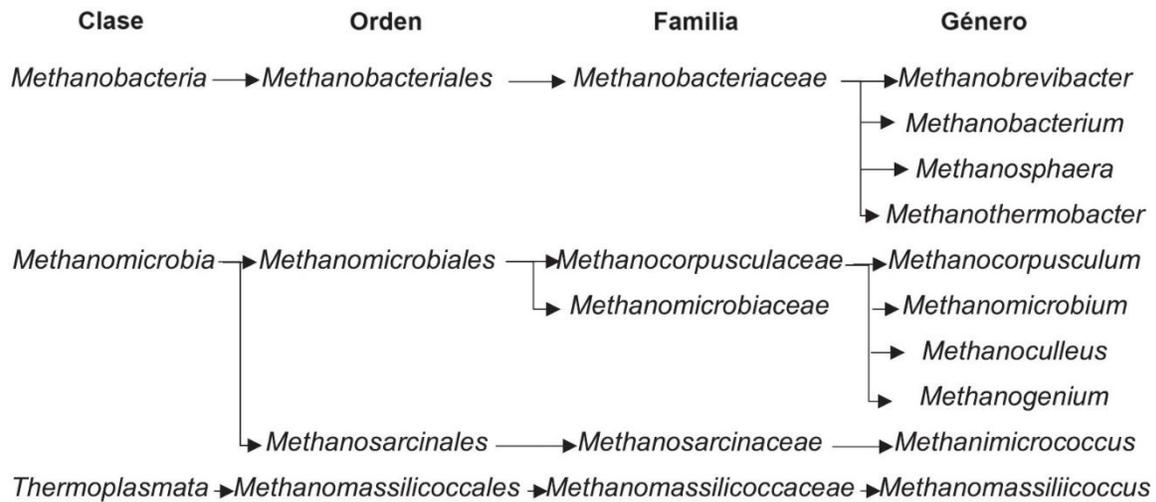


Figura 2. Sistematización de géneros de metanógenos detectados en no rumiantes
Tomado de Misiukiewicz *et al.* (2021)

Respecto a la actividad de la población microbiana que habita en el ciego del conejo, Mi *et al.* (2018) encontraron abundancias relativamente bajas de metanógenos en el ciego, esto debido a un pH ácido de 5.8, lo cual es desfavorable para el crecimiento de arqueas metanogénicas. La menor abundancia de metanógenos y la disponibilidad de vías alternativas a la metanogénesis, como la acetogénesis podrían explicar los niveles relativamente bajos de emisión de CH₄ observados en conejos (Belenguer *et al.*, 2011).

Los metanógenos parecen establecerse lentamente en los conejos, Marounek *et al.* (1999) menciona que la metanogénesis comenzó a la edad de 6 semanas en uno de cada cuatro conejos, mientras tanto Piattoni *et al.* (1996) reportó que la producción de CH₄ estuvo casi ausente de la fermentación hasta los 32 días de edad, tras lo cual cambió repentinamente y siguió aumentando con la edad. En los conejos lactantes jóvenes, la acetogénesis reductora es probablemente una característica principal de la fermentación cecal que se sustituye parcialmente de

forma gradual por la metanogénesis con el aumento de la ingesta de alimentos sólidos (Piattoni *et al.*, 1996).

2.4 Población de conejos a nivel mundial

La producción de conejos en miles de cabezas a nivel mundial (Figura 3), destacando los principales países productores tales como China con un total de 99.169, China, Continental con 99.079, República de Corea con 27.019, seguido de Egipto, Nigeria, Ucrania, Federación de Rusia, Argelia, Sierra Leona y México con una producción de 1.410 cabezas.

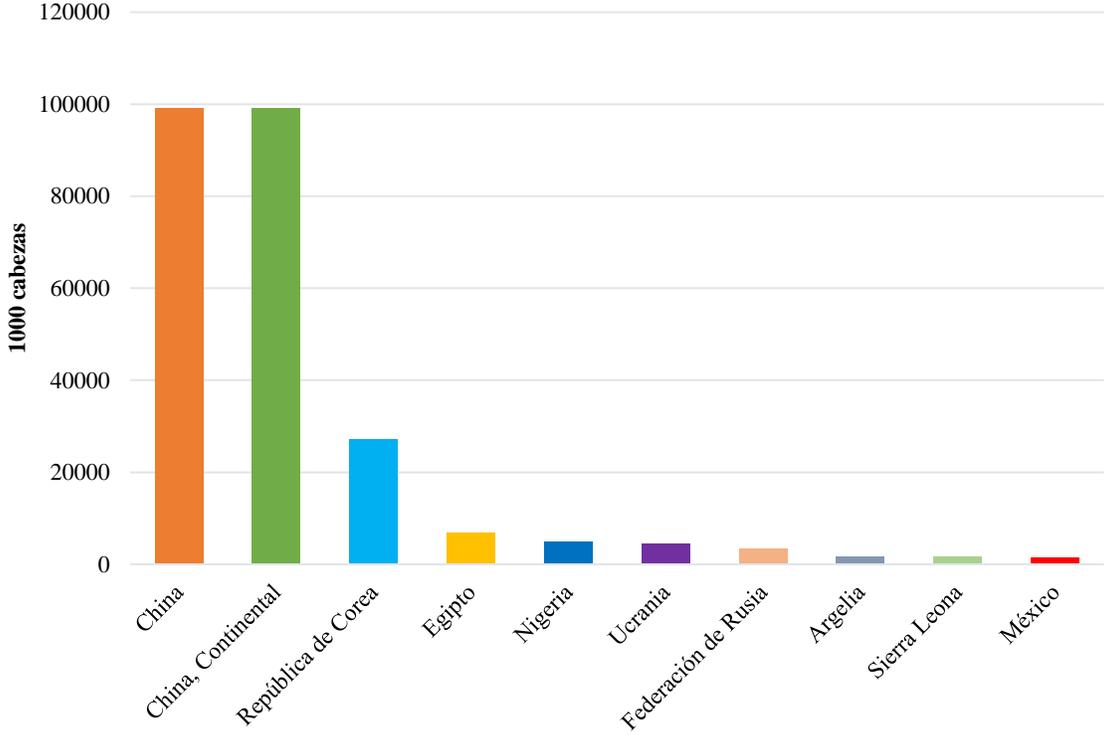


Figura 3. Producción de conejos a nivel mundial

Fuente: Adaptado de FAOSTAT (2021)

2.5 Producción nacional de conejos

Entre los principales estados con mayores índices de producción en México se encuentran el Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Morelos, CDMX, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y Jalisco (Jaramillo Villanueva *et al.*, 2015). El crecimiento en el número de cabezas de conejos en el período comprendido del 2012 al 2021 (Figura 4), en donde se puede observar un incremento en la producción de conejos, esto debido a la demanda por parte de los consumidores en adquirir un producto con un alto valor biológico caracterizado por un bajo nivel de grasa (Dalle Zotte y Szendrő, 2011).

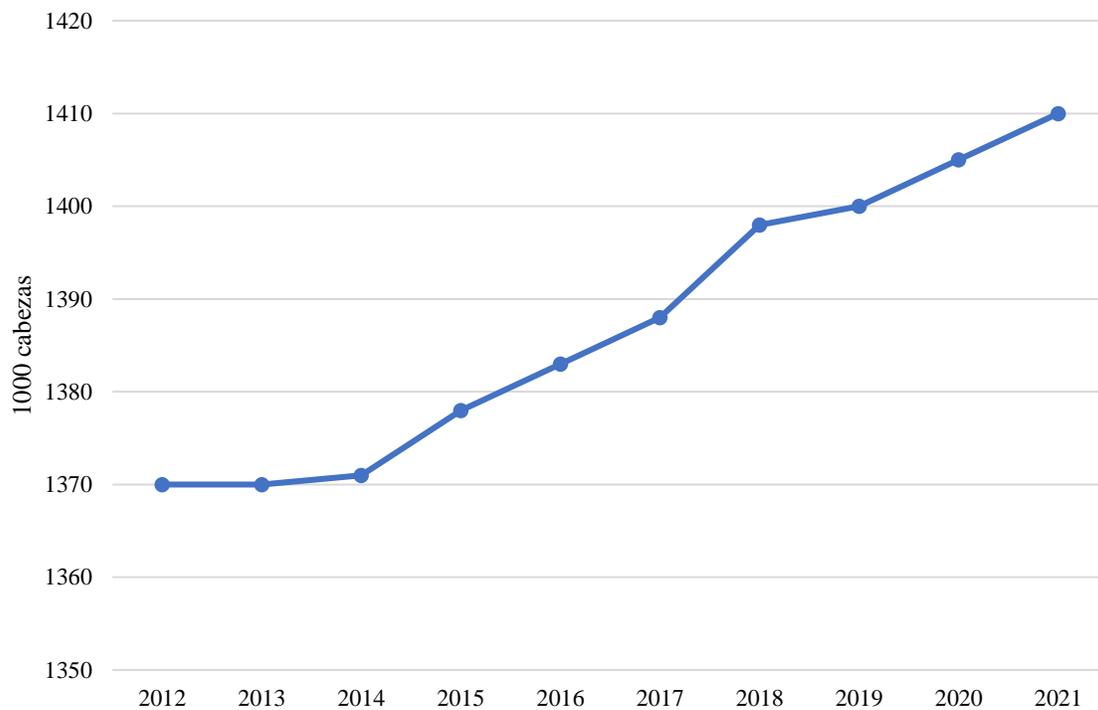


Figura 4. Número de cabezas de conejos en México del año 2012-2021

Fuente: Adaptado de FAOSTAT (2021)

2.6 Beneficios de la carne de conejo

Desde el punto de vista nutricional, la carne de conejo representa una alternativa ideal en la alimentación de todo tipo de consumidores, contiene alto contenido de proteínas, vitaminas del complejo B, minerales, siendo baja en sodio, grasa y colesterol (Dalle Zotte y Szendrő, 2011). Entre sus propiedades nutricionales (Cuadro 2), la carne de conejo se caracteriza por tener menos grasa (6.8 g/100 g) y calorías (618 kJ/100 g) en comparación con las carnes rojas, en cuanto al contenido de colesterol contiene los niveles más bajos (53 mg/100 g; Lukefahr *et al.*, 1989; Parigi Bini *et al.*, 1992).

Cuadro 2. Composición química y valor energético de distintos tipos de carne

	Agua (g)	Proteínas (g)	Lípidos (g)	Energía (kJ)
Cerdo				
Rango	60–75.3	17.2–19.9	3–22.1	418–1121
Promedio	70.5	18.5	8.7	639
Bovino				
Rango	66.3–71.5	18.1–21.3	3.1–14.6	473–854
Promedio	69.1	19.5	9	665
Pollo				
Rango	67.0–75.3	17.9–22.2	0.9–12.4	406–808
Promedio	72.2	20.1	6.6	586
Conejo				
Rango	66.2–75.3	18.1–23.7	0.6–14.4	427–849
Promedio	70.8	21.3	6.8	618

Adaptado de Salvini *et al.* (1998)

Según su composición grasa, la carne de conejo podría ser un alimento muy útil en la dieta humana (Cuadro 3), posee un contenido relativamente alto de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; Romans *et al.*, 1974; Ouhayoun *et al.*, 1985; Alasnier

y Gandemer, 1998;) y una relación FA-n6/FA-n3 muy baja (Castellini *et al.*, 1999). Sin embargo, el aumento del grado de insaturación de los tejidos animales mediante la manipulación dietética acelera el deterioro oxidativo durante el procesado y almacenamiento de la carne.

Cuadro 3. Composición de ácidos grasos y contenido de colesterol de distintos tipos de carne

	Cerdo ^a	Bovino ^a	Pollo ^b	Conejo ^c
C12:0	0.32	-	-	0.24
C14:0	1.22	2.52	0.62	3.14
C16:0	23.7	23.3	23.2	27.3
C18:0	11.7	13.7	8.2	7.9
C20:0	-	-	-	0.1
C22:0	-	-	-	0.004
AGS	37	39.5	32	38.6
C14:1 n-6	-	-	-	0.45
C16:1	3.14	4.2	5.62	6.67
C18:1 n-9	41.3	38.2	35.4	25.4
C20:1 n-9	-	-	-	0.31
MUFA	44.4	42.4	41	32.8
C18:2 n-6	14.3	6.3	20.1	20.7
C18:3 n-3	0.55	0.91	0.49	3.14
C20:4 n-6	3.63	2.36	3.64	0.032
C20:5 n-3	-	-	0.17	0.01
C22:6 n-3	-	-	0.66	0.008
PUFA	18.5	9.5	25.1	23.9
n-6/n-3	32.5	9.5	18	6.7
Colesterol	61	70	81	45

^aBanskalieva *et al.* (2000); ^bKomprda *et al.* (1999); ^cDalle Zotte *et al.* (2001); AGS: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

2.7 Tracto gastrointestinal del conejo

El conejo es un herbívoro, o más concretamente un folívoro, diseñado para existir con una dieta de succulenta vegetación verde, sin embargo, su tamaño hace que su metabolismo sea elevado, ha desarrollado un aparato digestivo radicalmente distinto al de los herbívoros más conocidos, como el caballo (fermentador del colon) y los rumiantes (fermentadores gástricos; Hirschfeld *et al.*, 1973). El conejo tiene un sistema que permite una ingesta elevada de alimentos (energía y proteínas), separa los componentes digeribles y fácilmente fermentables de la dieta y elimina rápidamente los residuos fibrosos de fermentación lenta (Michaeli *et al.*, 1980). Su sistema digestivo también elimina la necesidad de disponer de una gran superficie de absorción en el intestino grueso mediante la separación completa de los productos de la fermentación cecal y las heces, lo que permite la reingestión y absorción de las bacterias y sus subproductos en el intestino delgado (Cortopassi y Muhl, 1990). Debido a esta peculiaridad, el conejo posee una eficiente fisiología digestiva que le permite utilizar los alimentos fibrosos sin necesidad de almacenar grandes volúmenes en el cuerpo, su tracto gastrointestinal comprende un estómago simple, un ciego bien desarrollado y un mecanismo de separación dependiente de partículas del colon proximal (Figura 5), estas partículas son selectivamente retenidas y empleadas como sustratos para la fermentación microbiana en el ciego, la producción e indigestión de cecotrofos, lo que contribuye significativamente a la eficiente digestión del conejo (Sakaguchi, 2003).

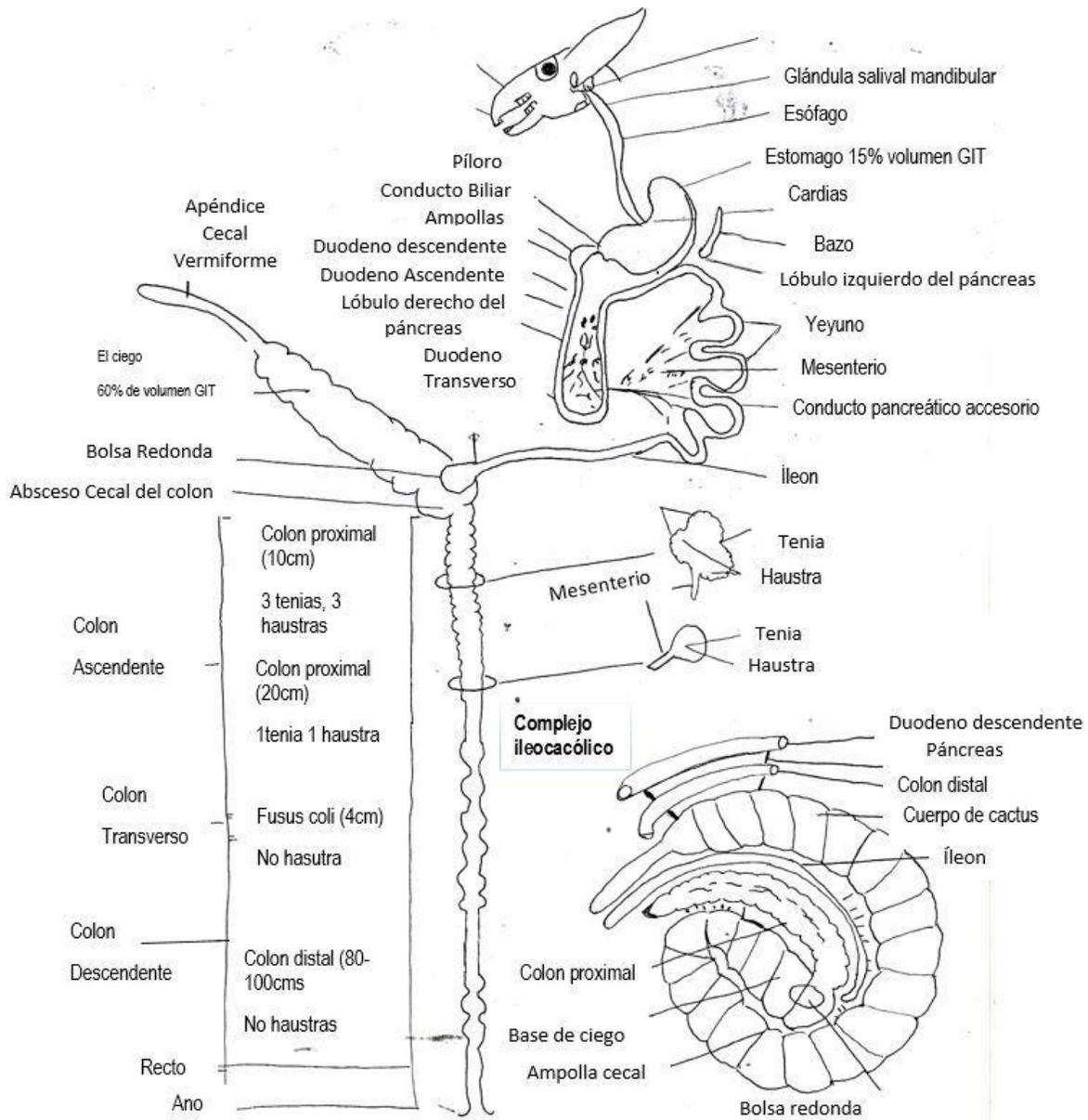


Figura 5. Esquema de la anatomía del tracto digestivo del conejo

Adaptado de Harcourt-Brown (2002)

Estómago

El tracto digestivo del conejo está representado por un estómago simple que comprende aproximadamente el 15 % del volumen gastrointestinal total, cuenta con

un esfínter cardíaco bien desarrollado que impide el vómito, la porción cardíaca del estómago tiene paredes delgadas, no es glandular y es intrínsecamente inmóvil se cree que la agitación del material alimenticio dentro del cardias se produce indirectamente debido a los movimientos del intestino grueso y a los movimientos locomotores del conejo, y no a causa de la motilidad gástrica intrínseca (Brewer y Cruise, 1994).

Los tricobezoares ("bolas de pelo"), que originalmente se creía que se debían simplemente a la ingestión de pelo, se consideran ahora en general el resultado de una disminución del movimiento gástrico, a menudo debido a la inactividad física del conejo o secundario a una motilidad reducida del intestino (Harcourt-Brown, 2002). El "fundus" es la principal porción secretora del estómago, y tiene células parietales (que secretan ácido clorhídrico y factor intrínseco) y células pépticas (que secretan pepsinógeno, precursor de la pepsina; Campbell-Ward, 2012). El pH gástrico del conejo varía considerablemente durante el transcurso del día, siendo en general ácido; después del consumo de alimento puede descender hasta 1.0 o 2.0, mientras que tras la ingestión de cecotrofos aumenta hasta 3.0 (Blas y Wiseman, 2010). Los conejos jóvenes (predestetados) tienen un pH gástrico mucho mayor (5.0 - 6.5), lo que favorece la supervivencia y el paso de las bacterias ingeridas, facilitando el establecimiento de la comunidad microbiana del intestino grueso (Harcourt-Brown, 2002).

Intestino delgado

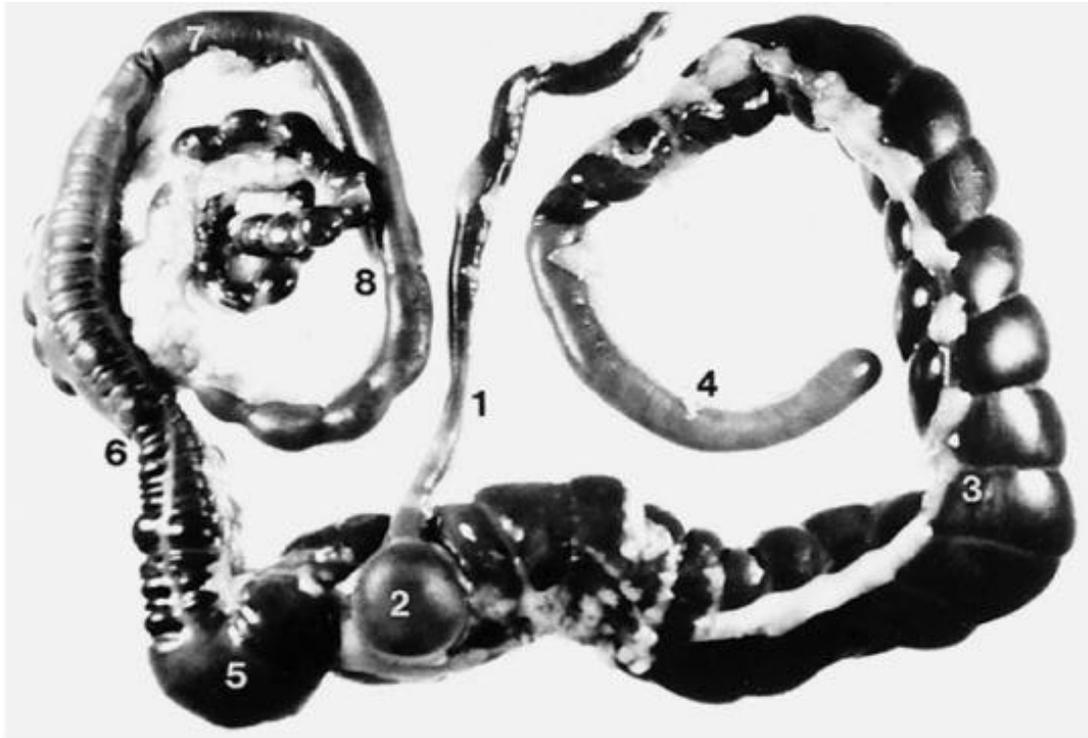
El intestino delgado es más corto en los conejos que en otras especies, constituye alrededor del 12% del volumen total del tracto gastrointestinal (Azzali y Arcari, 2000), en esta parte del tracto digestivo del conejo tiene lugar el proceso de segmentación, el cual está implicado en la mezcla del contenido intestinal mediante la constricción estática periódica de la pared intestinal, y es especialmente importante en el duodeno del conejo, por otra parte, la peristalsis implica un anillo de contracción que se mueve gradualmente a lo largo del intestino. En la regulación del movimiento peristáltico intervienen varias hormonas y péptidos gastrointestinales, como la colecistoquinina, la somatostatina y el péptido intestinal

vasoactivo (Cheeke, 1987). Las contracciones peristálticas se producen lentamente cada 10 - 15 minutos, y no se alteran con las fases del ciclo cecotrófico. Por otra parte el tiempo de retención del quimo se ha estimado entre 10 - 20 minutos en el yeyuno, y entre 30 - 60 minutos en el íleon (Blas y Gidenne, 1998).

En el extremo distal del íleon, dorsal al intestino grueso en el cuadrante abdominal caudal izquierdo, hay una ampolla muscular redonda denominada *Sacculus rotundus* formando la unión entre íleon, ciego y colon proximal (Figura 5), posee una función inmunológica y sólo se encuentra en lagomorfos (Jenkins, 2000). Esta estructura tiene un aspecto externo alveolado debido a la presencia de folículos linfáticos, también conocida como amígdala ileocecal, siendo un lugar común de impactación de cuerpos extraños (Jenkins, 1993).

Intestino grueso

Está muy desarrollado en el conejo comprende el ciego y colon (Figura 6), en términos básicos, el ciego actúa como una cámara de fermentación que facilita la descomposición de la fibra digerible y el almidón, mientras que el colon clasifica y empaqueta los excrementos; el proceso digestivo del conejo difiere del proceso de fermentación cecal y colónica habitual en muchos otros herbívoros en que la fibra se elimina lo más rápidamente posible (Campbell-Ward, 2012). El colon se divide funcionalmente en dos partes: el colon proximal, que se identifica macroscópicamente por la presencia de haustra (saculaciones), y la parte distal, que carece de haustra. En el colon proximal se produce la separación de la ingesta en fracciones digeribles e indigeribles, el proceso de separación se ve facilitado por una combinación de anatomía funcional y motilidad colónica. Las partículas digeribles (que tienden a ser más cortas) se depositan cerca de la mucosa y posteriormente son impulsadas en dirección retrógrada de vuelta al ciego mediante una serie de contracciones coordinadas.



Intestino grueso disecado de un conejo

- 1 íleon
- 2 Sacculus rotundus
- 3 cuerpo del ciego
- 4 apéndice vermiforme
- 5 ampolla coli
- 6 colon proximal
- 7 Fusus coli
- 8 colon distal

Figura 6. Disección del intestino grueso del conejo.

Tomado de Donnelly (2004)

Al mismo tiempo, las partículas más largas, gruesas y no digeribles tienden a permanecer en el centro de la luz del colon y se dirigen hacia el interior para formar gránulos fecales duros, siendo cruciales para estimular la motilidad gastrointestinal normal y para mantener los procesos fisiológicos vitales de regeneración celular, secreción, digestión, absorción, peristalsis y excreción (Hirakawa, 2001).

En la unión entre el colon proximal y distal hay una estructura denominada *Fusus coli* exclusiva de los lagomorfos, controla la motilidad colónica segmentaria, peristáltica y haustral y es responsable de exprimir mecánicamente el agua y los electrolitos de las heces duras antes de su expulsión. La reabsorción del agua y la eliminación de los solutos se produce en el colon distal. El *Fusus coli* se ve influido por hormonas como la aldosterona y las prostaglandinas (Harcourt-Brown, 2002).

Ciego

El ciego del conejo es proporcionalmente el mayor de todos los mamíferos, tiene el doble de longitud que la cavidad abdominal, representa el 40 – 60 % del volumen total del tracto gastrointestinal y tiene una capacidad 10 veces superior a la del estómago, sus paredes son finas y enrolladas terminando en el apéndice vermiforme formando el pliegue final (Campbell-Ward y Meredith, 2010; Jenkins, 2000). Es un tubo ciego de cinco pulgadas que termina en el flanco izquierdo dorsal a la primera parte del ciego y tiene paredes gruesas que contienen tejido linfoide (Barone, 1973; Brooks, 1997), este segrega iones de bicarbonato al lumen cecal el cual actúan como amortiguador de los ácidos grasos volátiles producidos por la fermentación cecal (Williams *et al.*, 1961; Cheeke, 1987). El ciego recibe las partículas cortas y el líquido retenido selectivamente por el colon proximal, por lo que su contenido suele ser de consistencia semifluida. La fermentación microbiana es el principal mecanismo por el que se liberan los nutrientes de los alimentos ingeridos, y las partículas retenidas dirigidas desde el colon proximal al ciego proporcionan el sustrato para la población autóctona de microorganismos cecales, algunos de los productos de la fermentación se absorben directamente a través de la pared cecal, mientras que muchos otros son expulsados y reingestados como cecotrofos (Harcourt-Brown, 2002).

El ciego proporciona una cámara de fermentación anaeróbica para organismos como *Bacteroides* spp., que se encuentran hasta en 10^9 / g, además de la ingesta, los mucopolisacáridos secretados por las células caliciformes de la mucosa constituyen una importante fuente de hidratos de carbono para la

fermentación cecal por *Bacteroides* spp (Fekete, 1989). Así mismo, suelen encontrarse otras especies bacterianas, tales como, *Bifidobacterium* spp., *Endophorus* spp., *Streptococcus* spp. y *Acuformis* spp. En el lumen intestinal se encuentran *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium* adheridos a la mucosa (Forsythe y Parker, 1985; Cheeke, 1987; Straw, 1988; Blas y Gidenne, 1998). En el contenido cecal se encuentran muchos protozoos no patógenos, incluidos protozoos ciliados morfológicamente similares a *Isotricha* de rumiantes (10^7 / mL), protozoos flagelados como *Eutrichomastix* spp., *Enteromonas* spp. y *Retortamonas* spp y un organismo ameboide, *Entamoeba cuniculi* (Lelkes y Chang, 1987; Owen, 1992).

La comunidad microbiana del ciego descompone el amoníaco, la urea, las proteínas y las enzimas del intestino delgado y la celulosa, también tiene la capacidad de metabolizar el xilano y la pectina (Blas y Gidenne, 1998). Los productos de este metabolismo son las estructuras proteicas y enzimáticas de los propios microorganismos (que posteriormente se digieren como cecotrofos), y los subproductos de la fermentación microbiana denominados colectivamente ácidos grasos volátiles. La degradación de la digesta que entra en el ciego por los microorganismos da como resultado la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), amoníaco, dióxido de carbono, metano e hidrógeno. La actividad fibrolítica del ciego no se lleva a cabo en conejos jóvenes de dos semanas de edad, mientras que la actividad celulolítica alcanza progresivamente su nivel máximo en torno a los 35 días de edad, por el contrario, la actividad xilanásica y pectinolítica parece aumentar entre las 10 y las 24 semanas de edad (Pinheiro *et al.*, 2001), se ha demostrado que la microbiota amilolítica ya es activa a las dos semanas de edad y parece estable entre los 15 y los 49 días (Padilha *et al.*, 1995) mientras que la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) cecales aumenta progresivamente (40 a 70 mmol/L) encontrando que los niveles de acetato (75 - 85%) son regularmente superiores a los de propionato (6 - 8%) o butirato (6 - 10%). La concentración de amoníaco en el ciego disminuye ligeramente con la edad (Gidenne y Fortun-Lamothe, 2002), tanto el aumento de los ácidos grasos volátiles como la disminución

de la concentración de amoníaco inducen una caída del pH cecal de los 15 a los 42 días de edad.

Cecotrofia

Es practicada por conejos, roedores y una variedad de otros animales (Thacker y Brandt, 1955), siendo parte normal del comportamiento circadiano del conejo, este ocurre aproximadamente a partir de la segunda y tercera semana de edad cuando los conejos comienzan a consumir alimentos sólidos (Jilge, 1982). Durante el transcurso del día los conejos excretan heces duras y redondas, mientras que por la noche son de consistencia blanda (Lockley, 1976), estas heces nocturnas son pequeñas y suaves (Figura 7) conocidos como “cecotrofos”, caracterizados por presentar una membrana verdosa cubiertos de moco que encierra la ingesta cecal semilíquida, contienen altas cantidades de vitaminas B y K, así como elevado contenido de proteínas.

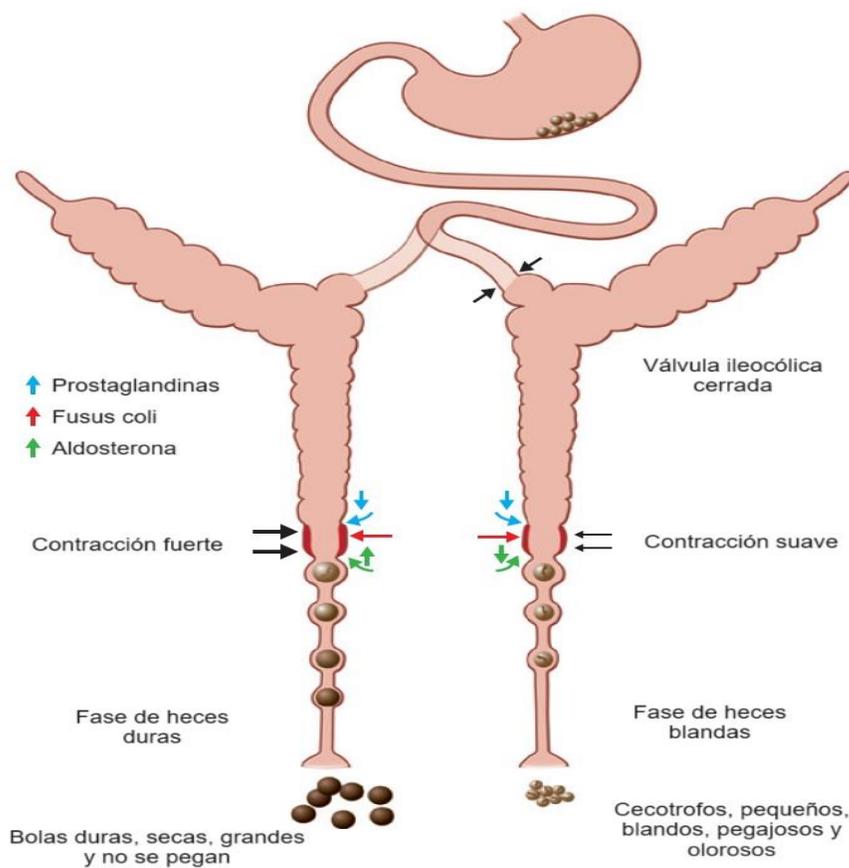


Figura 7. Proceso de formación de cecotrofos

Adaptado de Varga (2014)

El conejo ingiere estos cecotrofos directamente del ano (Figura 8) llevando a cabo una redigestión absorbiendo los nutrientes previamente no digeridos, de este modo el alimento ingerido puede pasar por el tracto gastrointestinal dos veces en un lapso de 24 horas (Eden, 1940; Yoshihara y Kandatsu, 1960). La excreción de heces sigue un marcado ritmo circadiano, alternando entre la fase de heces duras (que coincide con la actividad alimentaria) y la fase cecotrófica (que suele coincidir con un periodo de reposo de al menos 4 horas tras la alimentación); este ritmo está influido por la dieta, edad y el estado reproductivo (Carabano, 1998).



Figura 8. Ingestión de cecotrofos.
A, heces blandas; B, heces duras.

Tomado de Harcourt-Brown (2002)

2.8 Alimentación y nutrición

Una adecuada nutrición en el conejo brindará un adecuado estado de salud, mientras que al proporcionar una pobre nutrición contribuirá significativamente a un mal desarrollo dental, mayor susceptibilidad a enfermedades gastrointestinales y trastornos de comportamiento (Quesenberry y Carpenter, 2011)

Proteínas

Las necesidades de proteínas son elevadas en los animales jóvenes, no sólo para el crecimiento corporal, sino también para el desarrollo y la renovación de la mucosa intestinal, cuando los animales son alimentados con una dieta rica en proteínas existe un mayor flujo ileal de proteína aumentando la acidez cecal, lo cual puede favorecer a la presencia de especies patógenas (Gutiérrez *et al.*, 2003; Conde *et al.*, 2004; Gómez-Conde *et al.*, 2004; Nicodemus *et al.*, 2005) tal es el caso de *Clostridium*, los cuales se han encontrado cuando existe un aumento de proteínas en la dieta (Catala y Bonnafous, 1979; Haffar *et al.*, 1988).

Respecto a las recomendaciones de las necesidades nutricionales de conejos en crecimiento para los aminoácidos limitantes más frecuentes, siendo estos lisina, metionina y treonina (Maertens y Groote, 1988; Taboada *et al.*, 1994; De Blas *et al.*, 1998), en el Cuadro 4 se observan los requerimientos establecidos por NRC (1977), INRA (1984) y los presentados por de Blas y Mateos (1998), en donde estipulan que las recomendaciones actuales para lisina y la treonina son más elevadas (del 12 al 23 % respectivamente), estas diferencias podrían explicarse por la mayor productividad observada en los nuevos genotipos desarrollados, así como por las dietas utilizadas en los experimentos en que se determinaron estas recomendaciones.

Carbohidratos

Un punto importante al momento de formular dietas para conejos es determinar la mejor fuente de carbohidratos, las actividades de amilasa y disacaridasa aumentan con la edad, pero permanecen bajas durante los 25 a 35 días de edad (Corring *et al.*, 1972; Dojană *et al.*, 1998; Scapinello *et al.*, 1999), como consecuencia, la cantidad de almidón que llega al ciego y la mortalidad durante el periodo postdestete aumentan con el incremento de la concentración de almidón en la dieta (Blas y Wiseman, 2010).

Cuadro 4. Recomendaciones de proteína y aminoácidos para conejos en crecimiento y lactantes

	NRC (1977)		INRA (1984)		de Blas y Mateos (1998)	
	Crecimiento	Lactantes	Crecimiento	Lactantes	Crecimiento	Lactantes
Energía digestible (MJ/kg)	10.5	10.5	10.5	11.0	10.5	11.1
Proteína cruda (%)	16.0	17.0	16.0	18.0	15.3	18.4
Proteína digestible (%)					10.7	12.9
Lisina:						
Total (%)	0.65		0.65	0.75	0.75	0.84
Digestible (%)					0.59	0.66
Aminoácidos sulfurados:						
Total (%)	0.60		0.60	0.60	0.54	0.65
Digestible (%)					0.41	0.50
Treonina:						
Total (%)	0.60		0.55	0.70	0.64	0.70
Digestible (%)					0.44	0.48
Arginina (%)	0.60		0.90	0.90		
Histidina (%)	0.30		0.35	0.43		
Leucina (%)	1.10		1.05	1.25		
Isoleucina (%)	0.60		0.60	0.70		
Fenilalanina y Tirosina (%)	1.10		1.20	1.40		
Triptófano (%)	0.20		0.18	0.22		
Valina (%)	0.70		0.70	0.85		

Lípidos

Pocos estudios se han ocupado del papel de los lípidos de la dieta en la salud digestiva del conejo en crecimiento, ya que los niveles de lípidos en la dieta suelen ser inferiores al 3 % digiriéndose bien en el intestino delgado, sin embargo, recientemente se ha descubierto que algunos ácidos grasos de cadena media,

como los ácidos caprílico y cáprico (en forma de triacilglicerol), presentan actividad antimicrobiana para algunas bacterias de la flora digestiva cecal (Marounek *et al.*, 2002), teniendo un impacto favorable sobre la salud digestiva del conejo en crecimiento (Skřivanová y Marounek, 2006). Algunos ácidos grasos, como los de la clase omega 3, también estarían implicados en el desarrollo de la respuesta inmunitaria (Fortun-Lamothe y Boullier, 2004). Por su parte Maertens *et al.* (2005) señalaron una mayor viabilidad posdestete de las crías alimentadas con una dieta que tenía una relación n-3/n-6 baja (1,0 frente a 4,4), además, la adición de grasa a las dietas de iniciación aumenta la ingesta energética de los gazapos contribuyendo a mantener una buena condición nutricional corporal, por lo tanto, esto favorece una maduración digestiva, un desarrollo del sistema inmunitario, reduciendo así el riesgo de destete y mejorando la resistencia a los problemas digestivos.

Vitaminas y minerales

Las vitaminas se dividen en dos categorías: liposolubles e hidrosolubles (Cuadro 5), las vitaminas del complejo B, así como la vitamina C son hidrosolubles, éstas no se almacenan en el organismo y las porciones no utilizadas son eliminadas a través de la orina, sin embargo, la mayoría de las vitaminas del grupo B son sintetizadas por las bacterias del intestino posterior y son consumidas por el conejo durante la cecotofía, mientras que las vitaminas A, D, E y K son liposolubles, estas pueden almacenarse en el hígado y en los depósitos de grasa (Lebas, 2000).

En comparación con otras especies domésticas, la carne de conejo es relativamente pobre en sodio, con alto contenido en potasio y fósforo, por lo demás, los conejos presentan algunas particularidades como el alto contenido de minerales en la leche, las conejas muy prolíficas que producen grandes cantidades de leche pueden mostrar un déficit de calcio al final de la gestación o al principio de la lactación, con signos similares a los de la fiebre de la leche en vacas lecheras, un aporte excesivo de calcio se excreta por la orina, formando un precipitado característico, y podría dañar la estructura renal (Mateos *et al.*, 2010).

Además, los conejos son capaces de digerir parcialmente el ácido fólico en el ciego y reciclar el ácido fosfórico a través de las heces blandas (Marounek *et al.*,

2003), por consiguiente, la digestibilidad del ácido fítico es mayor en los conejos que en otras especies (Gutiérrez *et al.*, 2000). La mayoría de las vitaminas B, junto con la vitamina C y vitamina K, también son sintetizadas por la flora intestinal y recicladas por cecotrofia (Carabaño *et al.*, 2010), aunque podrían ser necesarios suplementos dietéticos para cubrir las necesidades, algunos otros minerales como el cloruro, el sodio y el potasio están presentes en las heces blandas en mayores concentraciones que en las heces duras (Hörnigke y Björnhag, 1980).

Cuadro 5. Requerimientos recomendados en la alimentación de conejos en diferentes etapas fisiológicas

Componentes de alimentos con 89% de materia seca	Conejo joven (4-12 semanas)	Cría lactante	Pre-destete	Mixto (maternidad + engorda)
Proteína cruda (%)	16	18	15	17
Proteína digestible (%)	11.5	13.3	10.8	12.4
Aminoácidos (%)				
Metiotina + cistina	0.6	0.6	0.55	0.6
Lisina	0.7	0.9	0.65	0.7
Arginina	0.9	0.8	0.8	0.9
Treonina	0.55	0.7	0.55	0.6
Triptófano	0.13	0.2	0.12	0.13
Histidina	0.35	0.43	0.35	0.4
Isoleucina	0.6	0.7	0.67	0.65
Fenilalanina + tirosina	1.2	1.4	1.1	1.25
Valina	0.6	0.85	0.68	0.8
Leucina	1.05	1.25	1	1.2
Energía				
Energía digestible (kcal/kg)	2,500	2,650	2,400	2,550
Energía metabolizable (kcal/kg)	2,380	2,520	2,280	2,420

Grasas (%)	3-5	4-5	3	3-4
Fibra cruda (%)				
Fibra cruda indigestible (%)	12	10	14	12
FDA (%)	18	14	20	18
Relación de proteína digestible/indigestible , energía (g/1,000 kcal)	45	51	46	48
Minerales (%)				
Calcio	0.4	1.2	1	1.1
Fósforo	0.3	0.5	0.5	0.6
Potasio	0.6	0.9	0.6	0.9
Sodio	0.3	0.3	0.3	0.3
Cloro	0.3	0.3	0.3	0.3
Magnesio	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitaminas.				
Vitamina A (UI/kg)	6,000	10,000	10,000	10,000
Vitamina D (UI/kg)	1,000	1,000	1,000	1,000
Vitamina E (ppm)	50	50	50	50
Vitamina K (ppm)	0	2	2	2
Vitamina C (ppm)	0	0	0	0
Vitamina B1 (ppm)	2	-	2	2
Vitamina B2 (ppm)	6	-	6	4
Vitamina B6 (ppm)	2	-	2	2
Vitamina B12 (ppm)	0.01	0	0.01	0.01
Ácido fólico (ppm)	5	-	5	5
Ácido pantoténico (ppm)	20	-	20	20
Niacina (ppm)	50	-	50	50
Biotina (ppm)	0.2	-	0.2	0.02

Adaptado de Lebas (2000)

2.9 Forrajes

Importancia de la fibra en la alimentación del conejo

El término "fibra" engloba varios componentes que tienen su propio efecto sobre la digestión y la salud, en los alimentos para animales el procedimiento de Van Soest *et al.* (1991) permite dividir algunas fracciones de fibra utilizando varios criterios analíticos; por ejemplo, el criterio de fibra ácido-detergente (FDA), el cual recupera las fracciones de celulosa y lignina (Figura 9), la dieta natural del conejo se basa principalmente en una gran variedad de pastos, hierbas y hojas (Marques y Mathias, 2001), por lo que se ha recomendado proveer a los conejos heno *ad libitum*, vegetales verdes, así como proporcionar pellets con alto contenido en fibra (Bradley, 2004; Stapleton, 2014). La inclusión de fibra no digerible en las dietas de conejos es considerada importante para el funcionamiento normal del mecanismo de separación del colón (Davies y Davies, 2003), en los sistemas de producción cunícola, se ha demostrado que al incrementar el nivel de fibra dietaria se reduce la incidencia de diarreas asociadas a los altos índices de mortalidad (Gidenne, 2003, 2015).

Se ha demostrado que la concentración óptima de fibra detergente neutro (FDN) en dietas para conejos es del 33.5% en base al alimento (Blas y Wiseman, 2010), la fibra dietética ayuda a mantener una alta tasa de pasaje, evitando la acumulación de digesta en el ciego que reduce el consumo de alimento perjudicando el crecimiento (De Blas *et al.*, 1999). La fibra alimentaria es un sustrato para los microorganismos cecales, su fermentación produce principalmente ácidos grasos volátiles, que pueden reducir la incidencia de trastornos digestivos (Gidenne, 1996), además de suministrar energía al animal la fermentación cecal también aumenta el suministro de proteína microbiana de alta calidad a través de la cecotrofia.

La fibra dietética exhibe numerosos beneficios a lo largo del sistema digestivo sobre el consumo de alimento, eficiencia digestiva y actividad microbiana (Knudsen, 2001; Wenk, 2001), la fibra puede afectar la salud digestiva del conejo, lo cual ha sido claramente demostrado en conejos en crecimiento, ya que las deficiencias de fibra en la dieta afectan los procesos digestivos normales (Bellier y Gidenne, 1996). La presencia de problemas digestivos es originada debido a una actividad

microbiana cecal deficiente o desequilibrada de la flora simbiótica (Buddington y Weiher, 1999).

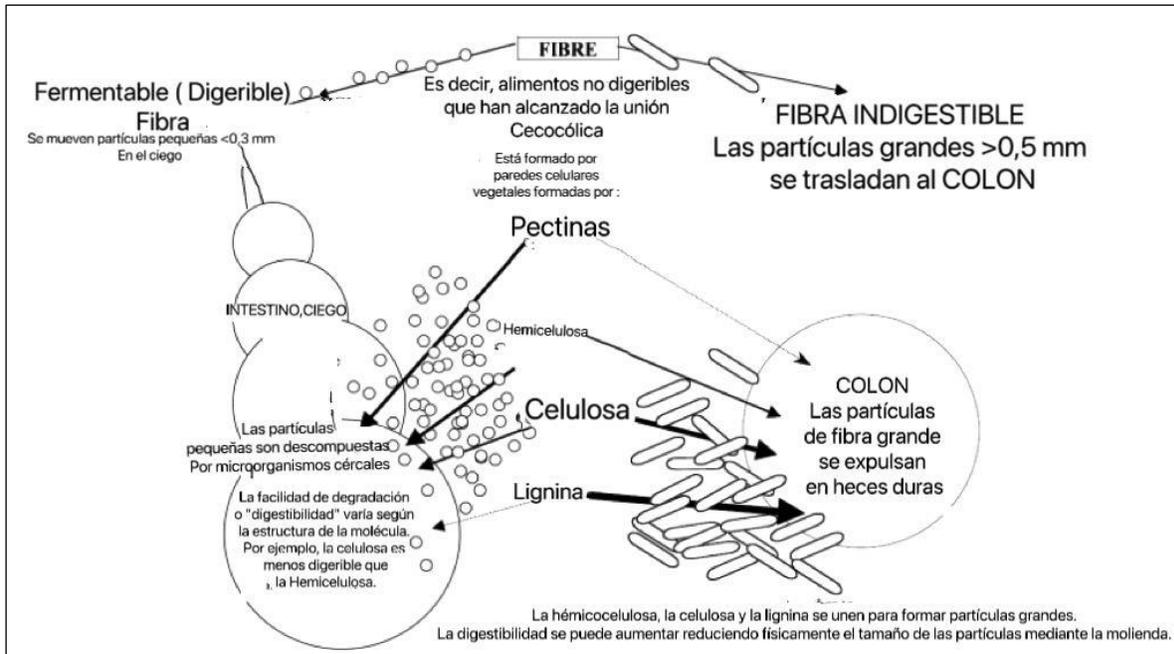


Figura 9. Digestión de la fibra en conejos

Tomado de Harcourt-Brown (1981)

El heno de alfalfa es la fuente de fibra más utilizada, representando alrededor del 50% de la FDN total de la dieta con una tasa de paso relativamente alta (Gidenne, 1992), siendo un sustrato adecuado para la fermentación cecal (García *et al.*, 1995). La inclusión de fuentes de fibra como la paja de trigo de gran tamaño de partícula, disminuye el peso del contenido y la acidez cecales (De Blas *et al.*, 1986), trabajos recientes utilizando dietas con un único tipo de fibra han demostrado una mayor influencia del tamaño de partícula que de la composición química sobre la digestibilidad de la fibra y el tiempo medio de retención de la digesta en el intestino (García *et al.*, 1999).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al creciente índice poblacional a nivel mundial, es necesario satisfacer la demanda de alimentos de alta valor biológico, esta demanda está impulsada por varios factores, como el aumento de la urbanización, los cambios en las dietas y las preferencias alimentarias, la carne es una fuente concentrada de proteínas y nutrientes esenciales, sin embargo, tiene implicaciones significativas en términos de uso de recursos, emisiones de gases de efecto invernadero y problemas de bienestar animal. La producción de carne, especialmente la carne de rumiantes tiene un alto impacto ambiental, ya que requiere grandes cantidades de agua, tierra y alimentos para criar y mantener el ganado. Además, la producción de animales para carne es responsable de una parte sustancial de las emisiones de gases de efecto invernadero, lo que contribuye al cambio climático. Dada la creciente preocupación por los impactos ambientales de la producción de carne, han aumentado investigaciones en la búsqueda de alternativas sostenibles, la producción de conejos ha emergido como una alternativa prometedora debido a sus ventajas únicas y a las cualidades nutritivas de su carne. Además, la calidad de la carne de conejo presenta características particulares que la distinguen de otras carnes de origen animal, caracterizándose por ser rica en proteínas, vitaminas y con un bajo porcentaje de grasa, por lo que resulta ideal para el consumidor que opta por incluirla como parte de su plan de alimentación.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto de una dieta formulada en comparación a una dieta comercial en la mitigación de metano bajo condiciones de producción de gas *in vitro*.

4.2 Específicos

- Determinar la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) con la adición de diferentes dietas para conejos
- Cuantificar la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico), la relación acético:propiónico y AGV totales por cromatografía de gases.

5 HIPÓTESIS

La implementación de una dieta formulada en comparación a una dieta comercial modificará los parámetros de fermentación dando como resultado menor producción de CH₄ y CO₂, siendo una alternativa a emplear en la dieta de conejos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Amecameca (Posta Zootécnica y Laboratorio Multidisciplinario de Investigación) de la Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, Estado de México.

6.1 Inóculo e incubaciones *in vitro*

El inóculo para el estudio *in vitro* que se utilizó para esta investigación fue líquido ruminal, esto debido a la relación que existe entre la población microbiana de rumiantes como de no rumiantes específicamente en la población de metanógenos productores de CH₄. Se colectó prepanchal de un bovino donador Holstein fistulado en rumen, cuya dieta consistió en ensilado de maíz (50%) y una mezcla de veza de invierno (25%) con avena forrajera (25%). El líquido ruminal se colocó en un termo a temperatura de 39 °C, posteriormente fue trasladado al laboratorio, donde se filtró empleando cuatro capas de tela gasa con la finalidad de obtener exclusivamente la fracción líquida saturándolo con dióxido de carbono. Posteriormente se procedió a realizar la mezcla correspondiente de líquido ruminal y solución mineral reducida en una relación 1:9 para lo cual se emplearon frascos ámbar con una capacidad de 120 ml a los cuales se les adicionó 500 mg de la dieta formulada (Cuadro 6), así como de cada una de las dietas comerciales: A: dieta formulada; B: Malta; C: Purina; D: Unión Tepexpan (Cuadro 7), a cada frasco se agregó 90 ml de líquido ruminal estandarizado con un flujo constante de CO₂, se incluyeron cuatro frascos como blancos (líquido ruminal estandarizado; (Theodorou *et al.*, 1994). Transcurrido el tiempo de incubación se estimó la emisión de CH₄ y CO₂ mediante la metodología descrita por Menke (1988) empleando una jeringa de vidrio graduada volumétricamente la cual contenía el gas producido durante la fermentación y transferido a una solución con hidróxido de sodio para la cuantificación de gases.

6.2 Determinación de ácidos grasos volátiles

Se determinó la concentración de AGV mediante la técnica de cromatografía de gases en muestras preparadas con ácido metafosfórico (25 % p/v) en una relación 4:1 (Erwin *et al.*, 1961). Pasadas las horas de medición se tomaron 0.8 µl de muestra la cual se colocó en una alícuota agregándole 0.2 µl de ácido metafosfórico y centrifugadas a 10000 g x 10 min, posteriormente se tomó el sobrenadante y se depositó en un vial para la medición de AGV empleando un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Clarus 580) utilizando una columna capilar de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Agilent Technologies, modelo HP-FFAP) y nitrógeno como gas acarreador.

Cuadro 6. Ingredientes empleados en la dieta para conejos

<i>Ingredientes, %</i>	
Trigo, salvado	14
alfalfa, heno	28
Avena, heno	15
Maíz, grano	25
Soya, pasta	15
Aceite vegetal	2
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	0.3
Premezcla mineral*	0.7

*Vitalal: 0,50% Azufre, 24,0% Calcio, 12,0% Cloro, 3,0% Fósforo, 2,0% Magnesio, 0,50% Potasio, 8,0% Sodio, 5.000 mg/kg Zinc, 60 mg/kg Cobalto, 5. 0 mg/kg Cromo, 2.000 mg/kg Hierro, 4.000 mg/kg Manganeso, 30 mg/kg Selenio, 100 mg/kg Yodo, 500.000 UI Vitamina A, 150.000 UI Vitamina D, 1.000 UI Vitamina E, 2.000 mg/kg Lasalocida, 0,05%.

Cuadro 7. Composición química reportada en etiquetas de alimentos comerciales para conejos

	*A	*B	*C	*D
MS, %	91.2	88	87	88
PC, %	17.7	16	16	16.50
Grasa, %	-	3	1.50	3
ELN, %	-	42	-	44.50
Cenizas, %	5.40	10	-	9

A: dieta formulada; B: Malta; C: Purina; D: Unión Tepexpan; MS: Materia seca; PC: Proteína cruda; ELN: Extracto libre de nitrógeno.

6.3 Diseño experimental

Los resultados obtenidos de la fase experimental se analizaron mediante un diseño completamente al azar, empleando la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia de $P < 0.05$, empleando el JMP de SAS (Sall *et al.*, 2012).

El diseño experimental se explicará mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Variable respuesta

μ : Media general

τ_i : Efecto del tratamiento

ε_{ij} : Error experimental

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios *in vitro* representan una opción a emplear para evaluar distintos aditivos alimenticios, tal como se muestra en esta investigación (Cuadro 8), la producción de metano ($P < 0.05$) fue menor con el alimento comercial para conejos Purina, en comparación a los demás alimentos, así como con la dieta formulada, por lo que se atribuye el efecto presentado a la composición del alimento, por el tipo de carbohidratos, proteínas y lípidos, siendo estos los que influyen en generación de CH_4 , así como factores fisiológicos como el tiempo de retención del alimento (Patra *et al.*, 2017; Warner *et al.*, 2017), tal como menciona Ku-Vera *et al.* (2020) el principal factor de la ración que determina la síntesis de metano es el tipo de carbohidrato fermentado, ya sea estructural (celulosa, hemicelulosa) típico de las raciones con forrajes o no estructural (almidón, azúcares solubles) propias de las raciones con granos (concentrado). Se ha demostrado que dietas a base de concentrado se asocian a una menor producción de CH_4 (g/kg MS; Johnson y Johnson, 1995), ya que la fermentación del almidón contenido en el concentrado genera mayor producción de propionato y menos CH_4 .

Por otra parte, la actividad de la población de microorganismos presentes en el ciego de conejos, específicamente los metanógenos, esta influenciada por el tipo de alimentación, tal como reporta Mi *et al.* (2018) quienes observaron abundancias relativamente bajas de metanógenos en el ciego de conejos atribuyendo al pH ácido de 5.8 el cual resulta desfavorable para el crecimiento de arqueas metanogénicas favoreciendo las acetogénicas, del mismo modo Belenguer *et al.* (2011) menciona que la menor abundancia de metanógenos y la disponibilidad de vías alternativas a la metanogénesis para la eliminación de H_2 , como la acetogénesis explica los niveles relativamente bajos de emisión de CH_4 en conejos.

Se ha demostrado que el tamaño de partícula de fibra afecta la diversidad y densidad de metanógenos en el ciego, tal es el caso del estudio de Liu *et al.* (2018) quienes disminuyeron el tamaño de partícula de las fibras (2500 a 10 μm), asociando esto a una reducción en la diversidad de metanógenos dando como resultado un aumento de la producción de CH_4 del 0.11 al 0.23% de la ingesta

energética bruta, así mismo Wang *et al.* (2004) observó una mayor producción de CH₄ con una dieta que contenía fibra dietética soluble en comparación con una dieta baja en fibra soluble (0.63 vs 0.35 %). Así mismo, se ha observado que la tasa de pasaje está correlacionada con la producción de CH₄ (Janssen, 2010; Goopy *et al.*, 2014), en este sentido el ciego es un tracto tubiforme por lo que la tasa de paso de la digesta es más rápida a través del ciego de conejo contribuyendo a menor producción de CH₄ (Mi *et al.*, 2018), esto es consistente con lo reportado por Von Engelhardt *et al.* (1978), quienes reportaron una alta tasa de pasaje y baja producción de CH₄ de canguros.

Cuadro 8. Efecto del tipo de dieta para conejos en producción de metano y parámetros de fermentación

	*A	*B	*C	*D	EEM	P-value
CH ₄ , ml	36.7 ^a	32.7 ^b	33.7 ^{ab}	37.3 ^a	0.8333	0.0108
CO ₂ , ml	83.0	81.7	83.0	84.3	1.2909	0.5722
Acético, %	63.1	62.7	60.2	62.5	2.1990	0.7898
Propiónico, %	26.9	28.7	32.1	30.1	1.5443	0.1876
Butírico, %	10.0	8.5	7.7	7.4	0.8515	0.2023
A:P	2.4	2.2	1.8	2.1	0.2218	0.4063
AGV total, mm/L	8.7 ^b	11.3 ^a	11.9 ^a	10.9 ^{ab}	0.5298	0.0132

*A, B, C, D: dietas comerciales (A: 17.7% PC; B: 16% PC; C: 16% PC; D: 16.5% PC); EEM: error estándar de la media; A:P: relación acético-propiónico; P<0.05

Investigaciones han demostrado que la degradabilidad de la fibra influye en los parámetros de fermentación y la tasa de pasaje aumentando la producción de AGV totales (Rinne *et al.*, 1997; Owens *et al.*, 2009). Los AGV son productos finales de la fermentación en el ciego y constituyen una importante fuente de energía para el conejo (Bellier y Gidenne, 1996), los resultados observados en este estudio al

evaluar los distintos alimentos en conejos no se encontraron efectos significativos en la producción de ácido acético, propiónico y butírico ($P>0.05$), sin embargo, investigaciones mencionan que existe una correlación en la producción de ácido acético con la producción de metano (Haque, 2018; Bica *et al.*, 2020), así mismo Williams *et al.* (2019) demostró que la producción de AGV debe ser determinante para predecir las emisiones de CH_4 . Aunque los resultados obtenidos de esta investigación no mostraron efectos significativos en la relación A:P, se ha reportado que las emisiones de CH_4 están generalmente relacionadas con la proporción de acetato propionato (Haque, 2018). Se ha demostrado que el nivel de fibra en la dieta influye en la producción de AGV, Gidenne *et al.* (2000) observaron una disminución lineal del nivel de AGV cecales con el aumento del aporte de fibra dietética, siendo un efecto opuesto al observado por Bellier y Gidenne (1996) mientras que García *et al.* (2002) no encontraron cambios en la producción de AGV cecales en conejos en finalización.

8 CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio en condiciones *in vitro* mostraron que la dieta comercial C fue la que menor producción de metano generó con mayor concentración de AGV totales, sin embargo, se recomienda seguir evaluando distintos aditivos alimenticios para la alimentación de conejos que disminuyan las emisiones de CH₄ y que no representen elevados costos económicos para los sistemas de producción cunícola.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alasnier, C., y Gandemer, G. (1998). Fatty acid and aldehyde composition of individual phospholipid classes of rabbit skeletal muscles is related to the metabolic type of the fibre. *Meat Science*, 48(3-4), 225-235.
- Banskalieva, V., Sahlu, T. a., y Goetsch, A. (2000). Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. *Small Ruminant Research*, 37(3), 255-268.
- Barone, R. (1973). *Atlas d'anatomie du lapin*. Masson y C Editeurs, Boulevard Saint-Germain, 75-78.
- Bava, L., Zucali, M., Sandrucci, A., y Tamburini, A. (2017). Environmental impact of the typical heavy pig production in Italy. *Journal of Cleaner Production*, 140, 685-691.
- Belenguer, A., Fondevila, M., Balcells, J., Abecia, L., Lachica, M., y Carro, M. (2011). Methanogenesis in rabbit caecum as affected by the fermentation pattern: in vitro and in vivo measurements. *World Rabbit Science*, 19(2), 75-83.
- Bellier, R., y Gidenne, T. (1996). Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *British Journal of Nutrition*, 75(3), 353-363.
- Biagini, D., Montoneri, E., Rosato, R., Lazzaroni, C., y Dinuccio, E. (2021). Reducing ammonia and GHG emissions from rabbit rearing through a feed additive produced from green urban residues. *Sustainable Production and Consumption*, 27, 1-9.
- Bica, R., Palarea-Albaladejo, J., Kew, W., Uhrin, D., Pacheco, D., Macrae, A., y Dewhurst, R. J. (2020). Nuclear magnetic resonance to detect rumen metabolites associated with enteric methane emissions from beef cattle. *Scientific Reports*, 10(1), 5578.
- Blas, C. d., y Wiseman, J. (2010). *Nutrition of the Rabbit*. Cabi.

- Blas, E., y Gidenne, T. (1998). Digestion of starch and sugars. *The Nutrition of the Rabbit*, 17-38.
- Bradley, T. (2004). Rabbit care and husbandry. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 7(2), 299-313.
- Brewer, N., y Cruise, L. (1994). Anatomy (Chap 3) and Physiology (Chap 4). In *The Biology of the Laboratory Rabbit* (pp. 63-71). Academic Press, San Diego.
- Brooks, D. (1997). Nutrition and gastrointestinal physiology. *Ferrets, Rabbits and Rodents—Clinical Medicine and Surgery*. Hillyer EW, Quesenberry KE eds, WB Saunders, London, 169-175.
- Buddington, R. K., y Weiher, E. (1999). The application of ecological principles and fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract ecosystem. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1446S-1450S.
- Campbell-Ward, M., y Meredith, A. (2010). Rabbits. In *BSAVA manual of exotic pets* (pp. 76-102). BSAVA Library.
- Campbell-Ward, M. L. (2012). Gastrointestinal physiology and nutrition. *Ferrets, Rabbits, and Rodents*, 183-192.
- Carabano, R. (1998). The digestive system of the rabbit. *The Nutrition of the Rabbit*, 1-16.
- Carabaño, R., Piquer, J., Menoyo, D., y Badiola, I. (2010). The digestive system of the rabbit. In *Nutrition of the Rabbit* (pp. 1-18). CABI Wallingford UK.
- Castellini, C., DAL BOSCO, A., y Bernardini, M. (1999). Effetto dell'integrazione alimentare di acidi grassi polinsaturi della serie n-3 sulla composizione lipidica e sulla stabilità ossidativa della carne di coniglio. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 2(25), 63-70.
- Catala, J., y Bonnafous, R. (1979). Modifications de la microflore quantitative, de l'excrétion fécale et du transit intestinal chez le lapin, après ligature du canal pancréatique. *Annales Zootechnie*, 28, 128.

- Cesari, V., Zucali, M., Bava, L., Gislou, G., Tamburini, A., y Toschi, I. (2018). Environmental impact of rabbit meat: The effect of production efficiency. *Meat Science*, 145, 447-454.
- Cheeke, P. (1987). *Rabbit Feeding and Nutrition* Academic Press Inc. New York.
- Clauss, M., Dittmann, M.-T., Vendl, C., Hagen, K. B., Frei, S., Ortmann, S., Müller, D. W., Hammer, S., Munn, A. J., y Schwarm, A. (2020). Comparative methane production in mammalian herbivores. *Animal*, 14(S1), s113-s123.
- Conde, M. S. G., Chamorro, S., Martín, N. N., de Blas Beorlegui, C., García, J., y Carabaño, R. (2004). Efecto del tipo de fibra en la alimentación de gazapos destetados precozmente. XXIX Symposium de cunicultura de ASESCU: Lugo, 31 de marzo y 1 de abril de 2004,
- Corring, T., Lebas, F., Courtot, D., Gueugneau, A.-M., Sardi, G., y Baudet, J.-J. (1972). Contrôle de l'évolution de l'équipement enzymatique du pancréas exocrine du lapin de la naissance à 6 semaines. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*,
- Cortopassi, D., y Muhl, Z. F. (1990). Videofluorographic analysis of tongue movement in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Morphology*, 204(2), 139-146.
- Dalle zotte, A., Chiericato, G., De Fassi Negrelli Rizzi, C., y Zakaria, H. (2001). Effet de la restriction alimentaire de la lapine nullipare sur le profile en acides gras des lipides des muscles des lapins issus de la première mise bas. In Proc. 9èmes Journées de la Recherche Cunicole (Vol. 1, pp. 23-26).
- Dalle Zotte, A., y Szendrő, Z. (2011). The role of rabbit meat as functional food. *Meat Science*, 88(3), 319-331.
- Davies, R. R., y Davies, J. A. R. (2003). Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 6(1), 139-153.
- De Bias, J., Santoma, G., Carabaño, R., y Fraga, M. J. (1986). Fiber and starch levels in fattening rabbit diets. *Journal of Animal Science*, 63(6), 1897-1904.

- De Blas, C., García, J., y Carabaño, R. (1999). Role of fibre in rabbit diets. A review. *Annales de Zootechnie*.
- De Blas, J., Taboada, E., Nicodemus, N., Campos, R., Piquer, J., y Méndez, J. (1998). Performance response of lactating and growing rabbits to dietary threonine content. *Animal Feed Science and Technology*, 70(1-2), 151-160.
- Dojană, N., Costache, M., y Dinischiotu, A. (1998). The activity of some digestive enzymes in domestic rabbits before and after weaning. *Animal Science*, 66(2), 501-507.
- Donnelly, T. M. (2004). Basic anatomy, physiology, and husbandry. *Ferrets, rabbits, and rodents*, 136-146.
- Eden, A. (1940). Coprophagy in the rabbit: origin of "night" faeces. *Nature*, 145(3677), 628-629.
- EPA, U. (2000). Inventory of US Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-1998.
- Erwin, E., Marco, G., y Emery, E. (1961). Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 44, 1768-1771.
- Faostat, F. (2016). FAOSTAT statistical database. Publisher: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Rome, Italy.
- Fekete, S. (1989). Recent findings and future perspectives of digestive physiology in rabbits: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37(3), 265-279.
- Forsythe, S., y Parker, D. (1985). Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *Journal of Applied Microbiology*, 58(4), 363-369.
- Fortun-Lamothe, L., y Boullier, S. (2004). Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. Proc.: 8th World Rabbit Congress,
- García, J., Carabaño, R., y De Blas, J. (1999). Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits. *Journal of Animal Science*, 77(4), 898-905.

- García, J., De Blas, J., Carabaño, R., y Garcia, P. (1995). Effect of type of lucerne hay on caecal fermentation and nitrogen contribution through caecotrophy in rabbits. *Reproduction Nutrition Development*, 35(3), 267-275.
- García, J., Gidenne, T., Falcao-e-Cunha, L., y de Blas, C. (2002). Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits. *Animal Research*, 51(2), 165-173.
- Gavrilova, O., Leip, A., Dong, H., MacDonald, J., Alfredo, C., Bravo, G., y Widiawati, Y. (2019). Refinement to the 2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. In *Emissions From Livestock and Manure Management*. 4. Intergovernmental Panel on Climate Change, Tokyo, 2019.
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Faluccci, A., y Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Gidenne, T. (1992). Effect of fibre level, particle size and adaptation period on digestibility and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbit. *British Journal of Nutrition*, 67(1), 133-146.
- Gidenne, T. (1996). Nutritional and ontogenic factors affecting the rabbit caeco-colic digestive physiology. *Proceedings of the World Rabbit Congress*, 1996,
- Gidenne, T., Pinheiro, V., y e Cunha, L. F. (2000). A comprehensive approach of the rabbit digestion: consequences of a reduction in dietary fibre supply. *Livestock Production Science*, 64(2-3), 225-237.
- Gidenne, T. (2003). Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science*, 81(2-3), 105-117.
- Gidenne, T. (2015). Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. *Animal*, 9(2), 227-242.

- Gidenne, T., y Fortun-Lamothe, L. (2002). Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Science*, 75(2), 169-184.
- Gómez-Conde, M., Chamorro, S., Nicodemus, N., García, J., Carabaño, R., y De Blas, C. (2004). Effect of the level of soluble fibre on ileal apparent digestibility at different ages. Proc. of the 8th World Rabbit Congress, C. Becerril and A. Pro (Eds.), Puebla, Mexico, 7-10 september, Colegio de Postgraduados for WRSA publ,
- Goopy, J. P., Donaldson, A., Hegarty, R., Vercoe, P. E., Haynes, F., Barnett, M., y Oddy, V. H. (2014). Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *British Journal of Nutrition*, 111(4), 578-585.
- Gutiérrez, I., Espinosa, A., García, J., Carabaño, R., y De Blas, C. (2003). Effect of protein source on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Animal Research*, 52(5), 461-471.
- Gutiérrez, I., García, J., Carabaño, R., Mateos, G., y De Blas, J. (2000). Effect of exogenous phytase on phosphorus and nitrogen digestibility in growing-finishing rabbits. *World Rabbit Science*, 8(suppl. 1), 277-281.
- Haffar, A., Laval, A., y Guillou, J.-P. (1988). Entérotoxémie à *Clostridium spiroforme* chez les lapins adultes. *Le Point vétérinaire: revue d'enseignement post-universitaire et de formation permanente*, 20(115), 99-102.
- Haque, M. N. (2018). Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of Animal Science and Technology*, 60(1), 1-10.
- Harcourt-Brown, F. (2002). Digestive disorders. *Textbook of rabbit medicine*, 249.
- Hirakawa, H. (2001). Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal review*, 31(1), 61-80.

- Hirschfeld, Z., Weinrab, M., y Michaeli, Y. (1973). The incisors of the rabbit: anatomy, physiology and post-natal development. *Journal of Dental Research*, 52, 377-384.
- Hörnigke, H., y Björnhag, G. (1980). Coprophagy and related strategies for digesta utilization. *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology, held at Clermont—Ferrand, on 3rd–7th September, 1979.*
- IPCC. (2006). *Guidelines for national greenhouse gas inventories.* Institute for Global Environmental Strategies, Hayama, Kanagawa, Japan.
- Janssen, P. H. (2010). Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160(1-2), 1-22.
- Jaramillo Villanueva, J. L., Vargas López, S., y Guerrero Rodríguez, J. d. D. (2015). Preferencias de consumidores y disponibilidad a pagar por atributos de calidad en carne de conejo orgánico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 6(2), 221-232.
- Jenkins, J. (1993). *Rabbits. Practitioner's guide to rabbits and ferrets.* American Animal Hospital Association, Lake wood, USA, 1-42.
- Jenkins, J. (2000). Rabbit and ferret liver and gastrointestinal testing. A Fudge, Edn., *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets.* Philadelphia. WB Saunders, 291-304.
- Jilge, B. (1982). Monophasic and diphasic patterns of the circadian caecotrophy rhythm of rabbits. *Laboratory Animals*, 16(1), 1-6.
- Johnson, K. A., y Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2483-2492.
- Johnson, D. E., y Ward, G. M. (1996). Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 42, 133-141.

- Knapp, J. R., Laur, G., Vadas, P. A., Weiss, W. P., y Tricarico, J. M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3231-3261.
- Knudsen, K. B. (2001). The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 90(1-2), 3-20.
- Komprda, T., Zelenka, P., Tieffova, P., Stohandlova, M., y Foltyn, J. (1999). Effect of the growth intensity on cholesterol and fatty acids content in broiler chicken breast and thigh muscle. *Proceeding of the XIV European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, Bologna, Italy,
- Koonawootrittriron, S., y Elzo, M. (2010). Challenges and opportunities for improvement in dairy production and genetic progress in Thailand. *Proceeding of the 14th AAAP Animal Science Congress*. Pingtung, Taiwan, Republic of China,
- Kušar, D., y Avguštin, G. (2010). Molecular profiling and identification of methanogenic archaeal species from rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 623-630.
- Ku-Vera, J. C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S. S., Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Arango, J., Gómez-Bravo, C. A., Aguilar-Pérez, C. F., y Solorio-Sánchez, F. J. (2020). Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 584.
- Lebas, F. (2000). Vitamins in rabbit nutrition: Literature review and recommendations. *World Rabbit Science*, 8(4), 185-192.
- Lebas, F., Coudert, P., Rouvier, R., y De Rochambeau, H. (1997). *The Rabbit: husbandry, health, and production* (Vol. 21). Food and Agriculture organization of the United Nations Rome.

- Lelkes, L., y Chang, C.-L. (1987). Microbial dysbiosis in rabbit mucoid enteropathy. *Laboratory Animal Science*, 37(6), 757-764.
- Liu, S., Yuan, M., Jin, D., Wang, Z., Zou, H., Wang, L., Xue, B., Wu, D., Tian, G., y Cai, J. (2018). Effects of the particle of ground alfalfa hay on the growth performance, methane production and archaeal populations of rabbits. *Plos one*, 13(9), e0203393.
- Lockley, R. M. (1976). *Private life of the rabbit*. Corgi.
- Lukefahr, S., Nwosu, C., y Rao, D. (1989). Cholesterol level of rabbit meat and trait relationships among growth, carcass and lean yield performances. *Journal of Animal Science*, 67(8), 2009-2017.
- Luo, Y.-h., Hua, L., Luo, J.-q., y Zhang, K.-y. (2013). Yeast-derived β -1, 3-glucan substrate significantly increased the diversity of methanogens during in vitro fermentation of porcine colonic digesta. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(12), 2229-2234.
- Luo, Y.-h., Su, Y., Wright, A.-D. G., Zhang, L.-l., Smidt, H., y Zhu, W.-y. (2012). Lean breed Landrace pigs harbor fecal methanogens at higher diversity and density than obese breed Erhualian pigs. *Archaea*, 2012.
- Luo, Y., Chen, H., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X., Tian, G., Yu, J., Huang, Z., y Luo, J. (2017). Dietary pea fiber increases diversity of colonic methanogens of pigs with a shift from *Methanobrevibacter* to *Methanomassiliicoccus*-like genus and change in numbers of three hydrogenotrophs. *BMC microbiology*, 17, 1-11.
- Lwin, K.-O., y Matsui, H. (2014). Comparative analysis of the methanogen diversity in horse and pony by using *mcrA* gene and archaeal 16S rRNA gene clone libraries. *Archaea*, 2014.
- MacDonald, G. K., Bennett, E. M., Potter, P. A., y Ramankutty, N. (2011). Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3086-3091.

- Maertens, L., Aerts, J., y De Brabander, D. (2005). Effect of a diet rich in n-3 fatty acids on the performances and milk composition of does and the viability of their progeny. Proceedings of the 11e Journées de la Recherche Cunicole, 29-30.
- Maertens, L., y Groote, G. d. (1988). The effect of the dietary protein-energy ratio and lysine content on the breeding results of does. Archiv fuer Gefluegelkunde (Germany, FR).
- Mao, S.-Y., Yang, C.-F., y Zhu, W.-Y. (2011). Phylogenetic analysis of methanogens in the pig feces. Current Microbiology, 62, 1386-1389.
- Marounek, M., Dušková, D., y Skřivanová, V. (2003). Hydrolysis of phytic acid and its availability in rabbits. British Journal of Nutrition, 89(3), 287-294.
- Marounek, M., Fievez, V., Mbanzamihiho, L., Demeyer, D., y Maertens, L. (1999). Age and incubation time effects on in vitro caecal fermentation pattern in rabbits before and after weaning. Archives of Animal Nutrition, 52(2), 195-201.
- Marounek, M., Skřivanová, V., y Savka, O. (2002). Effect of caprylic, capric and oleic acid on growth of rumen and rabbit caecal bacteria. Journal of Animal and Feed Sciences, 11(3), 507-516.
- Marques, C., y Mathias, M. (2001). The diet of the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.), on different coastal habitats of Central Portugal.
- Mateos, G., Rebollar, P., y Blas, C. d. (2010). Minerals, vitamins and additives. In Nutrition of the Rabbit (pp. 119-150). CABI Wallingford UK.
- Menke, K. H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Anim Res Dev, 28, 7-55. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387450798066432>.
- Mi, J., Peng, H., Wu, Y., Wang, Y., y Liao, X. (2019). Diversity and community of methanogens in the large intestine of finishing pigs. BMC Microbiology, 19, 1-9.

- Mi, L., Yang, B., Hu, X., Luo, Y., Liu, J., Yu, Z., y Wang, J. (2018). Comparative analysis of the microbiota between sheep rumen and rabbit cecum provides new insight into their differential methane production. *Frontiers in Microbiology*, 9, 575.
- Michaeli, Y., Hirschfeld, Z., y Weinreb, M. (1980). The cheek teeth of the rabbit: morphology, histology and development. *Cells Tissues Organs*, 106(2), 223-239.
- Misiukiewicz, A., Gao, M., Filipiak, W., Cieslak, A., Patra, A., y Szumacher-Strabel, M. (2021). Methanogens and methane production in the digestive systems of nonruminant farm animals. *Animal*, 15(1), 100060.
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., y Schmitz, R. A. (2018). Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends in Microbiology*, 26(1), 70-85.
- Nicodemus, N., Pérez-Alba, L., Carabaño, R., Blas, C. d., Badiola, I., Pérez de Rozas, A., y García, J. (2005). Effect of level of fibre and level of ground of fibre sources on digestion and ileal and caecal characterization of microbiota of early weaned rabbits. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress*, September 7-10, 2004, Pueblo, Mexico,
- Ouhayoun, J., Lebas, F., y Delmas, D. (1985). The effects of feeding regimes on growth and carcass quality in rabbit. *Cuni Sciences (France)*.
- Owen, D. (1992). *Laboratory animals handbook No. 12—parasites of laboratory animals*. In: London: Royal Society of Medicine Services Ltd.
- Owens, D., McGee, M., Boland, T., y O'kiely, P. (2009). Rumen fermentation, microbial protein synthesis, and nutrient flow to the omasum in cattle offered corn silage, grass silage, or whole-crop wheat. *Journal of Animal Science*, 87(2), 658-668.

- Padilha, M., Licois, D., Gidenne, T., Carré, B., y Fonty, G. (1995). Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction Nutrition Development*, 35(4), 375-386.
- Parigi Bini, R., Xiccato, G., Cinetto, M., Dalle Zotte, A., y Converso, R. (1992). Effetto dell'età e peso di macellazione e del sesso sulla qualità della carcassa e della carne cunicola. 1. Rilievi alla macellazione e qualità della carcassa. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 18, 157-172.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., y Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 1-18.
- Piattoni, F., Demeyer, D., y Maertens, L. (1996). In vitro study of the age-dependent caecal fermentation pattern and methanogenesis in young rabbits. *Reproduction Nutrition Development*, 36(3), 253-261.
- Pinheiro, V., Gidenne, T., Falcao, E. C. L., y Cunha, L. (2001). Effect of age on bacterial fibrolytic activity of caecal flora of rabbit. *Proc. European Meeting COST 848, Workshop Nutrition and Pathology Budapest, Hungary*,
- Quesenberry, K., y Carpenter, J. W. (2011). *Ferrets, Rabbits and Rodents-E-Book: Clinical Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences.
- Rinne, M., Jaakkola, S., y Huhtanen, P. (1997). Grass maturity effects on cattle fed silage-based diets. 1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Animal Feed Science and Technology*, 67(1), 1-17.
- Romans, J. R., Palmer, I. S., Wenger, D. R., Costello, W. J., Tuma, H. J., y Wahlstrom, R. C. (1974). Preslaughter Treatment Affecting Intramuscular and Plasma Lipids I. Effect of ACTH in Rabbits. *Journal of Animal Science*, 38(1), 32-37.
- Saengkerdsub, S., Anderson, R. C., Wilkinson, H. H., Kim, W.-K., Nisbet, D. J., y Ricke, S. C. (2007). Identification and quantification of methanogenic archaea

- in adult chicken ceca. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 353-356.
- Sakaguchi, E. (2003). Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal*, 74(5), 327-337.
- Salvini, S., Parpinel, M., Gnagnarella, P., Maisonneuve, P., y Turrini, A. (1998). Banca Dati di composizione degli alimenti per studi epidemiologici in Italia. Milano, Italy: Istituto Europeo di Oncologia.
- Scapinello, C., Gidenne, T., y Fortun-Lamothe, L. (1999). Digestive capacity of the rabbit during the post-weaning period, according to the milk/solid feed intake pattern before weaning. *Reproduction Nutrition Development*, 39(4), 423-432.
- Skřivanová, V., y Marounek, M. (2006). A note on the effect of triacylglycerols of caprylic and capric fatty acid on performance, mortality, and digestibility of nutrients in young rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 127(1-2), 161-168.
- Stapleton, N. (2014). The chubby bunny: a closer look at obesity in the pet rabbit. *The Veterinary Nurse*, 5(6), 312-319.
- Steinfeld, H. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. Food y Agriculture Org.
- Straw, E. (1988). Bacteria of rabbit gut and their role in the health of rabbit. *Applied Rabbit Research*, 3, 142-150.
- Taboada, E., Méndez, J., Mateos, G., y De Blas, J. (1994). The response of highly productive rabbits to dietary lysine content. *Livestock Production Science*, 40(3), 329-337.
- Thacker, E. J., y Brandt, C. S. (1955). Coprophagy in the Rabbit: One Figure. *The Journal of Nutrition*, 55(3), 375-385.

- Thangarajan, R., Bolan, N. S., Tian, G., Naidu, R., y Kunhikrishnan, A. (2013). Role of organic amendment application on greenhouse gas emission from soil. *Science of the Total Environment*, 465, 72-96.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., y 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.
- Tonhauzer, K., Zetochová, L., y Szemesová, J. (2023). The Emission from Rabbits Breeding in Slovakia. *Agriculture*, 13(8), 1468.
- Van Soest, P. v., Robertson, J. B., y Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
- Varga, M. (2014). Rabbit basic science. *Textbook of rabbit medicine*, 3.
- Von Engelhardt, W., Wolter, S., Lawrenz, H., y Hemsley, J. (1978). Production of methane in two non-ruminant herbivores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 60(3), 309-311.
- Wang, J., Zhu, Y., Li, D., Jørgensen, H., y Jensen, B. (2004). The influence of different fiber and starch types on nutrient balance and energy metabolism in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(2), 263-270.
- Warner, D., Bannink, A., Hatew, B., Van Laar, H., y Dijkstra, J. (2017). Effects of grass silage quality and level of feed intake on enteric methane production in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 95(8), 3687-3699.
- Wenk, C. (2001). The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Animal Feed Science and Technology*, 90(1-2), 21-33.
- Williams, J., Griffen, W., Sharma, A., y Wangensteen, O. (1961). Composition and source of secretion from lymphoid aggregations in the rabbit gut. *British Journal of Experimental Pathology*, 42(2), 153.

Williams, S. R. O., Hannah, M. C., Jacobs, J. L., Wales, W. J., y Moate, P. J. (2019). Volatile fatty acids in ruminal fluid can be used to predict methane yield of dairy cows. *Animals*, 9(12), 1006.

Yoshihara, I., y Kandatsu, M. (1960). Studies on Cecum Digestion: Part IV. On the Movement of Cecal Contents in the Rabbit (1). *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 24(6), 543-547.