



**DINÁMICA DE FERMENTACIÓN Y PRODUCCIÓN DE METANO DE DIETAS A BASE DE *Brachiaria humidicola* CON ALTOS NIVELES DE INCLUSIÓN DE *Enterolobium schomburgkii* (BENTH.) Y *Senna occidentalis* EN UN SISTEMA RUSITEC<sup>†</sup>**

**[FERMENTATION DYNAMICS AND METHANE PRODUCTION OF DIETS BASED ON *Brachiaria humidicola* WITH HIGH INCLUSION LEVELS OF *Enterolobium schomburgkii* AND *Senna occidentalis* IN A RUSITEC SYSTEM]**

**M. Vélez-Terranova, R. Campos-Gaona, H. Sánchez-Guerrero and L.A. Giraldo\***

*Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 32 No 12 -00 Chapinero, Vía Candelaria, Palmira - Valle del Cauca – Colombia. E-mails: omvelezt@unal.edu.co; rcamposg@unal.edu.co; hsanchezgu@unal.edu.co;*

*\* Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Laboratorio de Biotecnología ruminal- BIORUM. Email: lagirald@unal.edu.co*

*\*Corresponding author*

**RESUMEN**

Se estudiaron las características fermentativas y producción de metano de dietas con una alta inclusión de las plantas *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* sobre una dieta base de *Brachiaria humidicola* en el sistema semi-continuo de fermentación ruminal (Rusitec). Los tratamientos evaluados fueron: T<sub>1</sub>-100% *B. humidicola* (Control); T<sub>2</sub>- 40% *B. humidicola* + 60% *E. schomburgkii*; T<sub>3</sub> - 25% *B. humidicola* + 75% *E. schomburgkii* y T<sub>4</sub> - 25% *B. humidicola* + 75% *S. occidentalis*. En dos periodos de evaluación de 10 días (7 de adaptación y 3 de análisis) se evaluó la producción de gas, metano, ácidos grasos volátiles (AGV), amonio y la degradación de la materia seca y orgánica. Los resultados demostraron que una alta inclusión de *E. schomburgkii* reduce la producción de metano al afectar la degradación de la materia orgánica. Por su parte, *S. occidentalis* incrementa la degradación de la dieta y los niveles de amonio, valerato, isobutirato y AGVT, observándose una reducción promedio en la producción de metano del 29%. Varios mecanismos pueden estar determinando los menores volúmenes de metano observados con esta especie. Se requieren próximos estudios que permitan aislar y cuantificar la influencia de los metabolitos secundarios presentes en estas plantas sobre la metanogénesis ruminal.

**Palabras claves:** *Enterolobium schomburgkii*; *Senna occidentalis*; Metanogénesis ruminal; Rusitec.

**SUMMARY**

Fermentative characteristics and methane production of diets with high inclusion of *Enterolobium schomburgkii* and *Senna occidentalis* plants on a *Brachiaria humidicola* based diet were studied, using the semi-continuous ruminal fermentation system (Rusitec). The evaluated treatments were: T<sub>1</sub>-100% *B. humidicola* (Control); T<sub>2</sub>- 40% *B. humidicola* + 60% *E. schomburgkii*; T<sub>3</sub> - 25% *B. humidicola* + 75% *E. schomburgkii* y T<sub>4</sub> - 25% *B. humidicola* + 75% *S. occidentalis*. In two evaluation periods of 10 days (7 adaptation and 3 analysis), gas production, methane, volatile fatty acids (VFA), ammonia, and dry matter and organic matter degradation were evaluated. The results showed that a high inclusion of *E. schomburgkii* reduced methane production by affecting organic matter degradation. Meanwhile, *S. occidentalis* increased diet degradation and ammonia, valerate, isobutyrate and TVFA levels, observing an average reduction of 29% in methane production. Several mechanisms may be determining the lower methane volumes observed with this species. Further studies to isolate and quantify the influence of the secondary metabolites present in these plants on ruminal methanogenesis are required.

**Keywords:** *Enterolobium schomburgkii*; *Senna occidentalis*; Ruminal methanogenesis; Rusitec.

<sup>†</sup> Submitted October 31, 2016 – Accepted January 22, 2018. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License

## INTRODUCCIÓN

El metano es el principal gas de efecto invernadero que se genera durante la fermentación de los compuestos orgánicos de los alimentos en el tracto digestivo de los rumiantes (Brouce, 2014; Merino et al., 2011). Este gas, cuyo potencial de calentamiento es 25 veces superior que el CO<sub>2</sub>, persiste en la atmósfera entre 9 a 15 años, y es considerado como el que más aporta al calentamiento global. La fermentación entérica, es responsable del 15 al 24 % de las emisiones totales de metano proveniente de actividades antropogénicas, y su efecto es actualmente una problemática mundial. (Bhatta, 2015; Lenka et al., 2015; Ribeiro et al., 2015).

Diferentes estrategias se han propuesto para reducir la metanogénesis ruminal, la manipulación de la dieta a través del uso de plantas y sus metabolitos secundarios es una de las más promisorias dado que son compuestos naturales con propiedades antimicrobiales que permiten modificar favorablemente la fermentación y reducir la producción de metano (Kamra et al., 2015; Durmic y Blache, 2012). Desde las últimas dos décadas, varios esfuerzos investigativos se han realizado para identificar plantas o extractos con propiedades antimetanogénicas para su uso en nutrición de rumiantes (Bodas et al., 2008; García-González et al., 2008; Durmic et al., 2010; Durmic et al., 2013; Banik et al., 2013; Niderkorn y Macheboeuf, 2014).

Para la evaluación e identificación de metabolitos secundarios con potenciales antimetanogénicos, usualmente se ha hecho uso de técnicas *in vitro*, debido a que la experimentación *in vivo* es costosa, además de que es posible comprometer el bienestar animal, ya que el consumo en exceso de algunos de estos compuestos puede ser tóxico (Makkar y Vercoe, 2007; Kamra et al., 2015). La fermentación a corto plazo (eg. 24 h) a través de la técnica de producción de gases ha sido útil para la caracterización simultánea del potencial metanogénico de un alto número de plantas de manera rápida (Storm et al., 2012). A pesar de las ventajas que brinda esta técnica, sus resultados son limitados dado que este es un sistema cerrado que no permite simular el suministro constante de alimento, y tampoco se eliminan los productos finales de la fermentación, como ocurre normalmente durante la dinámica de fermentación (Vercoe y Durmic, 2009; Li, 2013). La experimentación *in vitro* en sistemas continuos o semicontinuos ofrece un escenario más dinámico que se asemeja en mayor proporción a lo que puede suceder a nivel ruminal, por lo que su uso es útil para confirmar a través del tiempo las propiedades bioactivas de estos compuestos sobre la fermentación general y la producción de metano (Li et al., 2014).

Los resultados de estos estudios sirven de base para el diseño de experimentos *in vivo* (Flachowsky y Lebzien, 2012).

Análisis realizados usando la técnica de producción de gas a 24 h (Vélez et al., 2017) sugieren que una alta dosificación de las plantas *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* en una dieta base de *Brachiaria humidicola*, tienen potencial para disminuir la producción de metano sin afectar la disponibilidad de nutrientes para el animal (AGV's o amonio ruminal). Al parecer, estas plantas presentan compuestos bioactivos que pueden ser útiles para reducir la metanogénesis ruminal, no obstante, aún se desconoce si este efecto persiste en el tiempo. El objetivo del presente estudio, es confirmar las características fermentativas de dietas a base de *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* sobre la producción de metano y la fermentación en general, usando el sistema semicontinuo de simulación ruminal "Rusitec".

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plantas

Durante la época seca (febrero de 2016) de las sabanas inundables del departamento de Arauca – Colombia, se realizó un recorrido por diferentes sistemas ganaderos para tomar muestras de hojas y tallos de las plantas *Senna occidentalis* y *Enterolobium schomburgkii*. Las muestras se recolectaron y almacenaron en bolsas negras de polietileno bajo refrigeración (4-6 °C) hasta su traslado al laboratorio donde fueron congeladas a -20 °C. La especie *Brachiaria humidicola* la cual fue utilizada como sustrato en la prueba de fermentación, se obtuvo de un sistema ganadero ubicado en el departamento del Valle del Cauca. Las plantas se secaron en un secador de capa fija a 55 °C hasta peso constante, y fueron molidas (molino de impacto de palas Retsch SK100 Standard, Retsch GmbH and Co, Haan, Alemania) y tamizadas a través de una malla de 2 mm para eliminar partículas más finas que se puedan perder durante el proceso de fermentación, y por lo tanto sobreestimar los valores de degradación de las dietas evaluadas.

### Tratamientos

Los tratamientos se definieron de acuerdo a resultados previos encontrados por Vélez et al. (2017), donde se encontró que la inclusión de hasta un 75% de las plantas *E. schomburgkii* y *S. occidentalis* sobre una dieta a base *Brachiaria humidicola* redujeron la producción de metano en un 15 y 18% respectivamente. Dado que una alta inclusión de la especie *E. schomburgkii* puede afectar

la degradación del sustrato, para el presente estudio se decidió evaluar 2 dosificaciones diferentes. De esta forma, se definieron 4 tratamientos: T<sub>1</sub>-100% *B. humidicola* (Control); T<sub>2</sub>- 40% *B. humidicola* + 60% *E. schomburgkii*; T<sub>3</sub> - 25% *B. humidicola* + 75% *E. schomburgkii* y T<sub>4</sub> - 25% *B. humidicola* + 75% *S. occidentalis*. La tabla 1 muestra el valor nutricional de los tratamientos.

Tabla 1. Composición nutricional (%) de las dietas evaluadas

	<i>B.h</i>	<i>E.s-60%</i>	<i>E.s-75%</i>	<i>S.o-75%</i>
MO	91.98	94.10	93.68	91.42
PC	6.27	17.67	17.82	22.43
FDN	79.81	67.43	64.86	24.21
FDA	39.70	42.46	43.15	15.87
Cenizas	8.02	5.90	6.32	8.58

*B.h:* *Brachiaria humidicola*; *E.s:* *Enterolobium schomburgkii*; *S.o:* *Senna occidentalis*.

MO: Materia orgánica; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutra; FDA: fibra detergente acida.

### Condiciones de Fermentación del sistema Rusitec

Para evaluar el efecto de los tratamientos, se utilizó la técnica semicontinua de simulación ruminal "Rusitec", el cual estaba equipado con 8 vasijas de fermentación (700 ml de volumen efectivo) sumergidas en un baño maría a 39 °C, las cuales fueron inoculadas y diariamente manipuladas de acuerdo a la metodología descrita por Czerkawski y Breckenridge (1977). El inoculo se obtuvo de dos vacas Holstein canuladas al rumen que consumían una dieta a base de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). El fluido ruminal se filtró a través de bolsas de nylon con tamaño de poro de 52 µm y se saturó con CO<sub>2</sub>, para su posterior uso en los fermentadores. En el primer día, cada vasija se llenó con 500 ml de líquido ruminal + 200 ml de saliva artificial (McDougall, 1948) + 2 bolsas de nylon (poro de 52 µm). Una bolsa se llenó con 15g de la dieta a evaluar, y la otra con 80g de contenido ruminal sólido para facilitar el establecimiento de condiciones de fermentación favorables. Después de 24h, las bolsas con contenido ruminal se reemplazaron con bolsas que contenían las dietas respectivas (15g) asignadas a cada fermentador. A partir de entonces, diariamente se reemplazaron aquellas bolsas que habían permanecido en los fermentadores por 48 h. Al final de este proceso, cada vasija se gasó con CO<sub>2</sub> por 30 segundos para reestablecer rápidamente las condiciones anaerobias. Para garantizar que el pH del medio se mantuviera durante los periodos experimentales realizados, cada día se preparó y suministró saliva artificial McDougall. (1948) a cada fermentador por medio de

una bomba peristáltica, asegurando una tasa de flujo de 500 ml/día en promedio.

Para el estudio, se realizaron 2 periodos de evaluación de 10 días (7 adaptación + 3 de medición). Dada la variación propia de cada fermentador, cada uno de ellos fue considerado como una unidad experimental independiente, similar a lo realizado por Bhatta et al. (2006), Romero-Pérez et al. (2015) y Li et al. (2014). En cada periodo, los 4 tratamientos fueron asignados aleatoriamente a los fermentadores de forma duplicada, con la intención de que al final del periodo experimental cada tratamiento presentara 4 observaciones.

### Procedimientos analíticos

Para evaluar la estabilidad del sistema en el tiempo, en cada periodo se midió diariamente el pH del medio durante el intercambio de las bolsas, utilizando un medidor de pH (Schott lab 850). Durante los días de medición las variables evaluadas fueron: producción de gas, metano, ácidos grasos volátiles (AGV), amonio y la degradación de la materia seca (MSD) y materia orgánica (DMO).

Los gases provenientes de cada fermentador se recolectaron en bolsas de aluminio (Tedlar 5 L, Tipo A, Tokyo Deodorant Co, Japón) y el volumen de gas se estimó usando un gasómetro Shinagawa (Modelo DC-1). Durante la medición, el gas de cada bolsa se pasó a través de un tubo conectado al gasómetro usando presión manual, al mismo tiempo, a través de una conexión externa unida al tubo, se insertó una aguja y con la ayuda de una jeringa se tomaron muestras de los gases expulsados de cada bolsa, los cuales posteriormente fueron inyectados en viales de borosilicato al vacío para luego ser analizados en un cromatógrafo de gases Shimadzu (GC-2014) con una columna capilar Agilent HP-PLOT Molesieve 5Å 0.32 mm ID 30 m × y un detector FID. Las temperaturas de la columna, puerto de inyección Split y de detección fueron 150, 100 y 300°C respectivamente. Se usó helio como gas de arrastre a una velocidad lineal de 35.4 cm/seg. Las muestras se inyectaron de forma manual con jeringas GasTight® de 1.00 mL y la producción de metano se estimó como proporción de la producción total de gas.

El efluente líquido de cada fermentador fue colectado en frascos de 1L, en los cuales se había adicionado 20 ml de ácido sulfúrico al 20% (v/v) para evitar que la fermentación continuara. El volumen del efluente se midió diariamente, y se tomaron muestras para la determinación de AGV y amonio. Para los AGV se tomaron 0.8 ml y se mezclaron con 0.5 ml de una solución desproteinizante y acidificante (10% ácido metafosfórico y 0.06% ácido crotónico p/v en HCl 0.5 N). Seguidamente se centrifugaron (13.000 rpm

por 10 minutos a 4°C) y se almacenaron a 4°C, para posteriormente ser analizados en un cromatógrafo de gases Shimadzu (GC-2014) equipado con una columna capilar Agilent HP-FFAP de 0.32 mm ID x 25 m de longitud y un detector de ionización de llama (FID), a temperaturas de 260 y 280°C para el puerto de inyección Split y de detección, respectivamente. Se utilizó helio como gas de arrastre a un flujo de 42 cm/seg. Para determinar el contenido de amonio, se tomaron muestras de 10 ml de efluente en tubos Falcon. Las muestras se centrifugaron (Biofuge Primo R Heraeus®) a 4000 rpm durante 4 minutos a 4°C, y la concentración de amonio se determinó usando un electrodo selectivo (ISE-NH<sub>3</sub>-N, Metrohm).

Para la determinación de la DMS, se colectaron las bolsas con los residuos que habían permanecido incubadas en los fermentadores por 48h. Posteriormente se lavaron con agua fría en una maquina lavadora y se secaron a 60°C por 48h. La DMS se estimó a partir de la pérdida de peso entre el principio y final del proceso de fermentación. En los residuos se determinó el contenido de cenizas para la estimación de la DMO.

#### **Determinación de nitratos en las hojas de *Senna occidentalis***

Se mezcló 0.200g de hojas molidas de *Senna occidentalis* con 50 ml de agua bidestilada la cual se agitó por 30 min para extraer los nitratos. La determinación se realizó a partir del método de reducción con cadmio, en el cual el nitrato se reduce a nitrito. Este último reacciona con sulfanilamida y naftil-etilendiamina para formar un complejo coloreado, que se midió a 540 nm con un espectrofotómetro UV/VIS.

#### **Análisis estadístico**

El experimento se realizó bajo un diseño en bloques completos al azar, donde el factor de bloqueo fueron los periodos de incubación. Los datos de cada una de las variables (pH, producción de gas, metano, AGV, amonio, DMS y DMO) se revisaron para identificar y eliminar datos extremos. Las medias de cada variable y sus respectivos errores estándar en cada medida repetida se reportan según sea el caso de datos faltantes.

Las variables evaluadas se analizaron a través de un modelo mixto de medidas repetidas. En el modelo se incluyeron los efectos fijos de tratamiento, día de medición y su interacción. El periodo de incubación se consideró un efecto aleatorio. En cada variable evaluada se analizaron diferentes estructuras de

covarianza y se estimó el mejor modelo de análisis teniendo como criterio de selección los coeficientes de información Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), utilizando la opción “Modelos lineales generales y mixtos” del software estadístico InfoStat (2013). Cuando la interacción entre los tratamientos y el día de medición fue significativa, se estimaron regresiones lineales dentro de cada tratamiento para estimar la unidad de cambio durante el periodo evaluado.

La comparación de medias se hizo utilizando la opción “Contrastes”, en donde se comparó cada tratamiento contra el control. Las diferencias se declararon significativas con un  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

Los parámetros pH, DMS, DMO, volumen de gas, metano, amonio, acetato, butirato, propionato, isobutirato y valerato de cada una de las dietas evaluadas no presentaron cambios significativos a través de los días de medición ( $P > 0.05$ ), a excepción de los AGVT y la relación A:P. La tabla 2 muestra el efecto de cada dieta sobre los parámetros de fermentación en cada uno de los días de medición.

El pH a las 24 h fue superior en los fermentadores con las dietas experimentales con respecto control ( $P < 0.05$ ), sin embargo, en los siguientes días (48 y 72 h) solo el tratamiento *E.s-75%* continuó mostrando diferencias ( $P < 0.05$ ).

En general, las dietas *E.s-60%* y *E.s-75%* redujeron en promedio la DMS en 10.3 y 15.3 % respectivamente en comparación con el control. Estas reducciones fueron significativas a las 24 h para ambas dietas y a las 72 h para *E.s-75%* ( $P < 0.05$ ). Por su parte, el tratamiento *S.o-75%* presento altos valores DMS en todos los horarios de medición ( $P < 0.05$ ), superiores a los encontrados en la dieta control en 70.6% en promedio. Esta misma tendencia se observó con la DMO, donde las dietas *E.s-60%* y *E.s-75%* disminuyeron este parámetro con respecto al control en 13.8 y 20.5 % respectivamente, mientras que *S.o-75%* lo incrementó en 79.5% (Figura 1).

Los volúmenes de producción de gas por unidad de materia seca y materia orgánica degradada fueron similares entre los tratamientos evaluados ( $P > 0.05$ ). Solo la dieta *S.o-75%* presento menores volúmenes con respecto a la dieta control ( $P < 0.05$ ) a las 48 (204 Vs 315 ml/g DMS; 234 Vs 386 ml/g DMO) y 72 h (186 Vs 349 ml/g DMS; 212 Vs 422 ml/g DMO).

**Tabla 2.** Parámetros de fermentación de las dietas evaluadas durante los 3 días de medición.

	<i>B.h</i>	EE	<i>E.s-60%</i>	EE	<i>E.s-75%</i>	EE	<i>S.o-75%</i>	EE
<b>24 h</b>								
pH	6.54	0.05	6.68*	0.05	6.71*	0.05	6.64*	0.05
DIVMS (%)	42.12	1.95	36.12*	1.95	35.73*	1.95	69.19*	1.95
DIVMO (%)	40.08	2.15	32.57*	2.15	31.96*	2.15	67.71*	2.15
Vol. Gas (ml/g DMS)	280	45.03	324	40.80	234	35.65	190	19.48
Vol. Gas (ml/g DMO)	321	57.55	391	49.32	290	50.01	214	23.23
CH <sub>4</sub> (ml/g DMS)	14	2.84	13	2.81	10	2.80	13	2.81
CH <sub>4</sub> (ml/g DMO)	16	3.78	15	3.75	13	3.73	14	3.75
Amonio (mg/L)	48	6.40	126*	11.97	159*	11.22	596*	33.88
<b>48 h</b>								
pH	6.57	0.05	6.6	0.05	6.69*	0.05	6.6	0.05
DIVMS (%)	37.89	1.95	36.35	1.95	33.62	1.95	68.71*	1.95
DIVMO (%)	34.35	2.15	32.76	2.15	28.98	2.15	66.79*	2.15
Vol. Gas (ml/g DMS)	315	44.34	288	40.80	259	35.65	204*	19.51
Vol. Gas (ml/g DMO)	386	56.63	360	49.32	334	50.01	234*	23.26
CH <sub>4</sub> (ml/g DMS)	18	2.82	12	2.80	11	2.81	13	2.80
CH <sub>4</sub> (ml/g DMO)	22	3.75	14	3.73	15	3.75	16	3.73
Amonio (mg/L)	42	6.40	155*	11.97	187*	11.22	549*	33.88
<b>72 h</b>								
pH	6.57	0.05	6.5	0.05	6.72*	0.05	6.63	0.05
DIVMS (%)	41.68	1.95	36.71	1.95	33.38*	1.95	69.72*	1.95
DIVMO (%)	38.27	2.15	31.76*	2.15	28.65*	2.15	67.89*	2.15
Vol. Gas (ml/g DMS)	349	44.30	297	40.80	240	35.65	186*	19.81
Vol. Gas (ml/g DMO)	422	56.56	383	49.32	313	50.01	212*	23.64
CH <sub>4</sub> (ml/g DMS)	20	3.51	15	3.51	13	3.51	13	3.51
CH <sub>4</sub> (ml/g DMO)	24	5.75	19	4.28	16	4.78	14	2.30
Amonio (mg/L)	51	6.40	154*	11.97	187*	11.22	664*	33.88

Medias en una misma fila con (\*) difieren estadísticamente con respecto al control ( $p < 0.05$ )

*B.h*: *Brachiaria humidicola*; *E.s*: *Enterolobium schomburgkii*; *S.o*: *Senna occidentalis*.

DIVMS: Degradación de la materia seca; DIVMO: Degradación de la materia orgánica.

EE: Error estándar.

En los volúmenes de producción de metano (por gramo de DMS o DMO) no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados ( $P > 0.05$ ), a pesar de que las dietas experimentales presentaron menores volúmenes que la dieta control. Estas diferencias fueron más notorias cuando se expresaron en porcentajes. De esta manera, la producción de metano por gramo de DMS a las 24 h se redujo en 7, 29 y 7 %, mientras que a las 48 y 72 h fue de 33, 39, 28 y 25, 35 y 35 % para *E.s-60%*, *E.s-75%* y *S.o-75%* respectivamente. Una situación similar se presentó con los volúmenes de metano por gramo de DMO. A las 24 h se encontró una disminución de 6, 19 y 7 % y a las 48 y 72 h fue de 36, 32, 27 y 21, 33 y 42 % para *E.s-60%*, *E.s-75%* y *S.o-75%* respectivamente (Figura 1). Lo anterior indica, que en promedio la producción total de metano por gramo de DMS y DMO en el periodo evaluado, se redujo en 23, 35, 25 y 23, 29 y 29 % con los tratamientos *E.s-60%*, *E.s-75%* y *S.o-75%* respectivamente.

Los niveles de amonio se incrementaron significativamente en las dietas experimentales, encontrándose diferencias estadísticas con el control en todos los días de medición ( $P < 0.05$ ). Los mayores niveles estuvieron asociados a la dieta *S.o-75%* con valores entre 549 y 664 mg/L muy superior a lo encontrado con los otros tratamientos.

La tabla 3 muestra la producción de AGV totales e individuales de los tratamientos en estudio. Con respecto a la dieta control, los AGVT se afectaron negativamente con *E.s-75%* a las 24 y 48 h ( $P < 0.05$ ). A las 72 h este parámetro se redujo tanto en *E.s-60%* como en *E.s-75%* ( $P < 0.05$ ). Con la dieta *S.o-75%* los AGVT se incrementaron en un 27 % en promedio con respecto a la dieta control (33 Vs 26 mmol/L -  $P < 0.05$ ). Durante el periodo evaluado, los AGVT en el tratamiento *E.s-75%* mostraron un incremento diario de 0.1 mmol/L ( $R^2 = 0.99$ ), mientras que en los tratamientos *E.s-60%* y *S.o-75%* se observó una reducción de 0.07 ( $R^2 = 0.63$ ) y 0.09 ( $R^2 = 0.51$ ) mmol/L respectivamente (Figura 1).

**Tabla 3.** Producción de ácidos grasos volátiles individuales y totales de las dietas experimentales.

	<i>B.h</i>	EE	<i>E.s-60%</i>	EE	<i>E.s-75%</i>	EE	<i>S.o-75%</i>	EE
<b>24 h</b>								
Acetato (mmol/L )	14.62	1.74	11.13*	1.72	9.13*	1.40	21.64*	2.03
Butirato (mmol/L)	2.52	0.14	1.93*	0.12	1.51*	0.08	5.56*	0.35
Propionato (mmol/L)	7.35	0.60	6.90	0.60	5.50*	0.60	6.95	0.60
Isobutirato (mmol/L)	0.11	0.01	0.07*	0.01	0.04*	0.01	0.75*	0.06
Valerato (mmol/L)	0.40	0.06	0.23*	0.03	0.13*	0.03	2.68*	0.17
AGVT (mmol/L)	25.89	2.85	22.54	2.85	16.55*	2.85	36.20*	2.85
Relación A:P	1.85	0.13	1.67*	0.13	1.71*	0.13	3.15*	0.13
<b>48 h</b>								
Acetato (mmol/L)	13.90	1.74	13.50	1.72	10.85*	1.40	16.48	2.03
Butirato (mmol/L)	2.76	0.14	2.02*	0.12	1.79*	0.08	4.33*	0.35
Propionato (mmol/L)	7.50	0.60	6.95	0.60	6.28	0.60	5.43*	0.60
Isobutirato (mmol/L)	0.10	0.01	0.08	0.01	0.05*	0.01	0.58*	0.06
Valerato (mmol/L)	0.43	0.06	0.23*	0.03	0.20*	0.03	2.20*	0.17
AGVT (mmol/L)	24.65	1.97	23.11	1.97	19.15*	1.97	30.48*	1.97
Relación A:P	1.86	0.13	1.75*	0.13	1.71*	0.13	3.0*	0.13
<b>72 h</b>								
Acetato (mmol/L)	15.06	1.74	10.89*	1.72	12.39	1.40	18.20	2.03
Butirato (mmol/L)	2.82	0.14	2.01*	0.12	1.82*	0.08	4.79*	0.35
Propionato (mmol/L)	7.50	0.60	6.03*	0.60	6.85	0.60	6.05*	0.60
Isobutirato (mmol/L)	0.11	0.01	0.07*	0.01	0.07*	0.01	0.65*	0.06
Valerato (mmol/L)	0.50	0.06	0.23*	0.03	0.18*	0.03	2.43*	0.17
AGVT (mmol/L)	26.45	2.14	19.02*	2.14	21.38*	2.14	31.98*	2.14
Relación A:P	1.81	0.13	1.80	0.13	1.73	0.13	2.98*	0.13

Medias en una misma fila con (\*) difieren estadísticamente con respecto al control ( $p < 0.05$ )

*B.h*: *Brachiaria humidicola*; *E.s*: *Enterolobium schomburgkii*; *S.o*: *Senna occidentalis*.

AGVT: Ácidos grasos volátiles totales; Relación A:P: Relación acetato:propionato.

EE: Error estándar.

En comparación con la dieta control, los niveles de acetato se redujeron con los tratamientos *E.s-60%* y *E.s-75%* durante los días de medición ( $P < 0.05$ ), mientras que con *S.o-75%* se observó un incremento a las 24 h de evaluación (21.6 Vs 14.6 mmol/L). Algo similar se encontró con las concentraciones de butirato, donde las dietas *E.s-60%* y *E.s-75%* alcanzaron reducciones en promedio de 26 y 37 % respectivamente, mientras que *S.o-75%* aumentó este parámetro en 81%. El propionato se afectó

negativamente con las dietas *E.s-75%* y *E.s-60%* a las 24 y 72h respectivamente, por su parte *S.o-75%* disminuyó este parámetro a las 48 y 72h ( $P < 0.05$ ). Los niveles de isobutirato y valerato se redujeron en promedio 33, 52, 48 y 61 % con la inclusión de *E.s-60%* y *E.s-75%* respectivamente. Por otro lado, el tratamiento *S.o-75%* generó incrementos en las proporciones de isobutirato y valerato en todos los horarios de medición ( $P < 0.05$ ), con valores promedio de 0.66 y 2.44 mmol/L respectivamente.

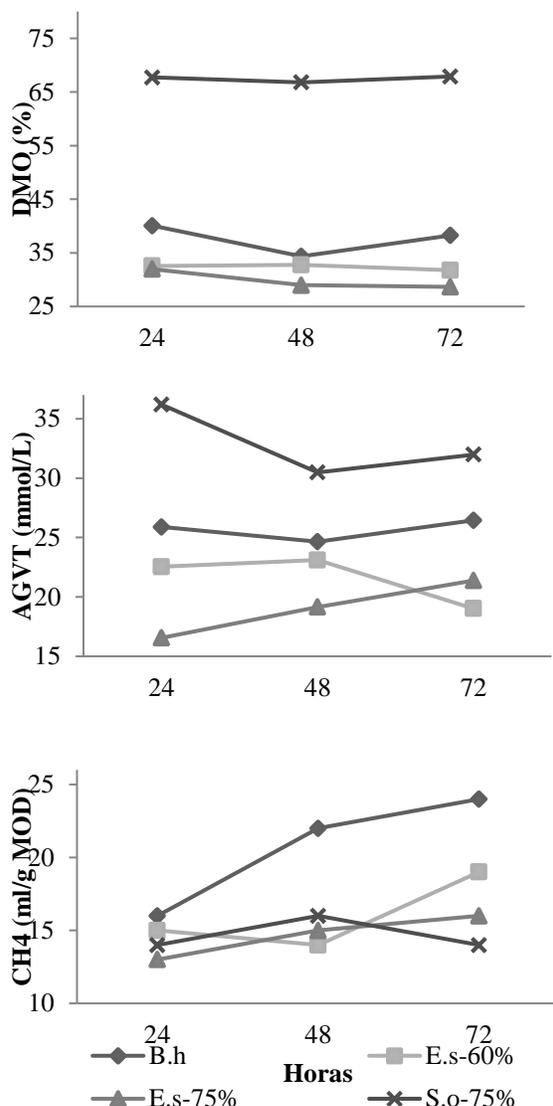


Figura 1. Degradación de la materia orgánica (superior), ácidos grasos volátiles totales (medio) y producción de metano (inferior) de las dietas experimentales durante el periodo de evaluación. B.h: *Brachiaria humidicola*; E.s: *Enterolobium schomburgkii*; S.o: *Senna occidentalis*.

En la relación A:P, las dietas *E.s-60%* y *E.s-75%* presentaron menores valores a las 24 y 48 h ( $P < 0.05$ ) en comparación con el control. En el tratamiento *S.o-75%* se presentaron los mayores valores de este parámetro (3 Vs 1.8 -  $P < 0.05$ ). Durante los días de medición se encontró que el tratamiento control y *S.o-75%* presentaron una tendencia a reducir la relación A:P por día en 0.00083 ( $R^2 = 0.57$ ) y 0.0035 ( $R^2 = 0.84$ ) unidades respectivamente. Por su parte, en las dietas *E.s-60%* y *E.s-75%* se observó una ligera tendencia a incrementar esta relación en 0.0027 ( $R^2 = 0.98$ ) y 0.00042 ( $R^2 = 0.75$ ) unidades respectivamente.

En la especie *Senna occidentalis* se encontraron niveles de nitratos del 0.05%

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó el efecto de dietas con una alta inclusión de las plantas *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* sobre la producción de metano y fermentación ruminal. Aunque las dosificaciones evaluadas fueron altas (60 - 75%) y pueden no representar lo que sucedería en un escenario real, el estudio se realizó con la intención de confirmar la persistencia del efecto antimetanogénico observado con estas dosis (Vélez et al., 2017), identificar el posible modo de acción y el efecto potencial sobre la fermentación en general a través del tiempo.

A pesar de que se encontraron diferencias entre los tratamientos para la variable pH, este parámetro se mantuvo en un rango de 6.54 y 6.71 ideal para una óptima degradación de los componentes fibrosos y orgánicos de las dietas en sistemas de fermentación continuos o semicontinuos (Hoover et al., 1984; Bhatta et al., 2006). La producción de metano presentó una tendencia inferior en las dietas experimentales en comparación con el control, aun cuando estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La menor producción de metano encontrada con la inclusión de las plantas *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* estuvo determinada por diferentes mecanismos fermentativos que influyeron sobre los parámetros evaluados.

Con los tratamientos *E.s-60%* y *E.s-75%* los volúmenes totales de metano (ml/g DMO) al final de periodo experimental se redujeron en 23 y 29% respectivamente, lo cual estuvo asociado en gran parte a la menor DMO encontrada en estas dietas (Bodas et al., 2012; Durmic et al., 2010). El tratamiento *E.s-75%* redujo en promedio la DMO en 21 % lo que se reflejó en menores concentraciones de AGVT y metano. No obstante, el efecto negativo sobre la DMO fue menor en la dieta *E.s-60%*, lo que evito que los AGVT sufrieran cambios significativos con respecto a la dieta control, a las 24 y 48 h. Efectos similares se han encontrado en las plantas *Biserrula pelecinus L.* y *Eremophila glabra* (Banik et al., 2013; Li, 2013).

La inclusión de la especie *Enterolobium schomburgkii* en los tratamientos *E.s-60%* y *E.s-75%* incrementó los niveles proteicos de la dieta (PC > 17%) lo que se vio reflejado en una mayor concentración diaria de amonio ruminal, con valores en promedio de 145 - 178 mg/L respectivamente, cercanos a los 200 mg/L recomendados por Leng.

(1990) para un adecuado aporte de nitrógeno en dietas a base de forrajes tropicales de baja digestibilidad. Dado que el amonio constituye entre el 50 - 80% del nitrógeno usado por los microorganismos ruminales para crecimiento y síntesis de células microbiales (Leng y Nolan, 1984), era de esperarse que el incremento en las concentraciones de amonio en las dietas *E.s-60%* y *E.s-75%*, soportara una mayor formación de células microbiales que favoreciera la degradación de los componentes orgánicos de la dieta, sin embargo, esta afirmación no concuerda con los resultados observados. Lo anterior sugiere que los compuestos secundarios presentes en la planta *Enterolobium schomburgkii* en las concentraciones usadas en este estudio, inhibieron la actividad de las diferentes poblaciones ruminales, siendo este efecto mayor en la dieta *E.s-75%* y menor en *E.s-60%*. Los reportes sobre la composición fitoquímica en esta planta son limitados, sin embargo, en especies pertenecientes al mismo género como *Enterolobium cyclocarpum* se ha reportado la presencia de saponinas (Martínez et al., 2012; Bobayemi, 2006; Rodríguez et al., 2009). Altas concentraciones de saponinas en la dieta pueden generar resultados similares a los encontrados con la planta *Enterolobium schomburgkii*. Excesos de saponinas reducen la digestibilidad a través de la inhibición directa sobre las poblaciones de protozoarios, como también sobre poblaciones de microorganismos celulíticos y hongos, encargados de la degradación del componente fibroso de los alimentos (Patra y Saxena, 2010).

Por otro lado, la inclusión de la especie *Senna occidentalis* en la dieta base generó resultados positivos sobre algunos de los parámetros de fermentación evaluados. Con esta dieta, la producción total de metano al final del periodo experimental se redujo en 29 %. También se encontraron aumentos significativos en la DMO (67 Vs 38 %) y la síntesis de amonio (603 Vs 44 mg/L) con respecto al control. La producción de gas se redujo (220 Vs 376 ml/g DMO), sin embargo, se incrementaron las concentraciones de AGVT (32.9 Vs 25.7 mmol/L), butirato (4.9 Vs 2.7 mmol/L), isobutirato (0.66 Vs 0.10 mmol/L), valerato (2.43 Vs 0.44 mmol/L) y la relación A:P (3.04 Vs 1.84). Estos resultados fueron similares a los encontrados en experimentos realizados a través de la técnica de producción de gases (Vélez et al., 2017).

El alto contenido proteico aportado por la especie *Senna occidentalis*, asociado con los excesos en los niveles de amonio presentes después del proceso de fermentación, sugirieron la presencia de nitratos en esta planta. No obstante, los resultados demostraron un nivel de presencia del 0.05 %, el cual es considerado bajo (Leng, 2008).

Las elevadas DMO y bajos niveles de producción de gas encontrados con *S.o-75%* pueden estar determinados por el incremento en el contenido proteico (PC: 22.4 Vs 6.2 del control) y bajos niveles de fibra (FDN: 24.2 Vs 79.8; FDA: 15.9 Vs 39.7 del control) en la dieta (Beauchemin et al., 2008), resultantes de la inclusión de *Senna occidentalis*. En los sistemas de fermentación *in vitro*, el componente proteico de los sustratos es degradado rápidamente, generando poco gas durante el proceso (Getachew et al., 2004) por lo que es común observar en dietas con altos niveles proteicos una mayor degradación y bajos volúmenes de gas. Estos resultados también sugieren que gran parte del componente orgánico degradado se destinó para la formación de proteína microbiana (Blummel et al., 1997). La abundante disponibilidad de amonio ruminal en conjunto con los aumentos en los niveles de isobutirato favorecieron la síntesis y crecimiento de células microbiales, las cuales incrementaron la eficiencia de degradación del sustrato (Wang et al., 2015; Liu et al., 2014) lo que se pudo ver reflejado en mayores concentraciones de AGVT. Es necesario resaltar que bajo los resultados del presente estudio, la fermentación de esqueletos carbonados provenientes de la desaminación de aminoácidos también pudo aportar a los incrementos observados en los AGVT (Bach et al., 2005).

Los menores volúmenes de metano encontrados durante los días de análisis con *S.o-75%* pueden estar asociados a diferentes factores. En primer lugar, dado que la degradación del componente proteico presente en esta dieta generó menores volúmenes de producción de gas, es posible que a su vez se hayan reducido las proporciones de metano que puedan estar presentes en este gas. Lee et al. (2003) también sugieren que el NH<sub>4</sub> que se libera a partir de la degradación de la proteína, se combina con CO<sub>2</sub> para formar (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>. De esta manera se reducen las moléculas de CO<sub>2</sub> requeridas para la metanogénesis. Varios estudios reportan la correlación negativa existente entre el contenido proteína cruda en la dieta y la producción de metano (Lee et al., 2003; Gemeda y Hassen, 2014). Otro factor determinante sobre la menor concentración de metano pudo estar asociado a la presencia de antraquinonas en *Senna occidentalis* (Yadav et al., 2010), las cuales generan efectos similares a los encontrados en el presente estudio con respecto a reducciones en la metanogénesis entre 25 y 36 % e incrementos en las concentraciones de amonio, digestibilidad de la dieta, butirato, valerato y la síntesis de ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (Sirohi et al., 2011; Garcia-Lopez et al., 1996; Ebrahimi et al., 2011).

La menor producción de metano y las reducciones en las concentraciones de propionato observadas a las 48 y 72 h, en conjunto con los incrementos de isobutirato y DMO, sugieren que los H<sub>2</sub> provenientes de la

fermentación del sustrato fueron utilizados por vías alternas, evitando así su acumulación y posterior efecto adverso sobre la fermentación (Ungerfeld, 2015). Varios mecanismos pudieron ser utilizados como aceptores de hidrógenos, entre los que se encuentran la síntesis de biomasa microbiana (Leng y Preston, 2010), producción de valerato (AGV glucogénico) (Kebreab et al., 2008; Ellis et al., 2008), la degradación de aminoácidos mediante la reacción de desaminación oxidativa (Wilkinson, 2012) y en menor proporción la reducción de los nitratos a amonio (Yang et al., 2016).

Los elevados niveles de amonio presentes en el tratamiento *S.o-75%*, estuvieron en exceso a lo requerido para el crecimiento microbiano aún para dietas de baja digestibilidad como las usadas en este estudio (Leng, 1990). Los excesos de amonio pudieron estar relacionados con una limitada disponibilidad de energía en la dieta (bajos niveles de carbohidratos de fácil degradación), la cual reduce la eficiencia de utilización de amonio para la síntesis de proteína microbiana, y por lo tanto se incrementan los niveles de este compuesto en el medio (Bach et al., 2005; Yu et al., 2010). También pudo influir la falta de sincronía en la que los nutrientes quedaban disponibles para su utilización, ya que en dietas a base de forrajes es común encontrar desbalances en la fermentación de carbohidratos y proteínas dado a que la fermentación de esta última es más rápida, por lo tanto, los microorganismos tienen más nitrógeno del que pueden utilizar lo que conlleva a una acumulación de amonio (Russell, 2002). Otros factores determinantes, están relacionados con las características del sistema Rusitec, las cuales son diferentes a lo que puede suceder en condiciones *in vivo*. En este equipo, los sustratos son fermentados durante un periodo fijo de 48 h (Czerkawski y Breckenridge, 1977), sin embargo, los bajos contenidos de fibra presentes en *S.o-75%* sugieren que esta dieta puede presentar menores tiempos de retención (tasas de pasaje más rápidas) lo que reduciría la degradación de proteína a nivel ruminal y por lo tanto el amonio (Van Soest, 1994). La falta de absorción en los fermentadores del equipo (Martínez et al., 2010) también pudo influir, dado que el exceso de amonio se elimina por absorción a través de las paredes del rumen o cuando fluye hacia el intestino delgado (Leng y Nolan, 1984).

Aunque las altas concentraciones de amonio estuvieron por encima de lo que se podría encontrar normalmente a nivel ruminal, estos niveles en exceso no inhiben el crecimiento microbiano (Satter y Slyter, 1974), sin embargo, pueden producir en el animal toxicidad por amonio debido a que se excede la capacidad del hígado de convertir este compuesto en urea, generando incrementos en las concentraciones de amonio en la sangre afectando directamente el

sistema nervioso central (Leng, 2008). A su vez, la transformación del amonio en urea representa un gasto energético para el animal de 12 Kcal/g N, y gran parte de este compuesto es excretado en la orina, lo que reduce la eficiencia de utilización del nitrógeno (Van Soest, 1994), y a su vez se convierte en una fuente potencial de gases de efecto invernadero a través del incremento en las emisiones de amonio y óxido nitroso a partir de las excretas (Lee y Beauchemin, 2014), reduciendo el beneficio neto sobre la menor producción de metano que se pueda observar *in vivo* con la inclusión de *S.o-75%*.

Los resultados obtenidos con *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* sugieren que la menor producción de metano observado con estas plantas pudo estar determinado, ya sea por un cambio en la composición química de la dieta, con mayores niveles de PC y menores de FDN (Tabla 1), que favorecieron la síntesis de otros productos metabólicos (eg. amonio, AGVT) sobre la producción de metano (Gemedá y Hassen, 2014; Janssen, 2010), o por la presencia de metabolitos secundarios con propiedades antimetanogénicas, los cuales presentan efectos similares a los de muchos otros compuestos, en donde para alcanzar reducciones considerables en la metanogénesis, es necesario incluirlos en niveles lo suficientemente altos como para generar también efectos adversos sobre la fermentación ruminal, mientras que en menores cantidades, el impacto negativo sobre la fermentación es menor, pero no se inhibe la producción de metano (Yang et al., 2016). De esta manera, para garantizar que los efectos encontrados sobre la producción de metano estuvieron determinados por los metabolitos secundarios presentes en estas plantas, es necesario la realización de próximos estudios que permitan aislar e identificar el o los compuestos responsables de este efecto y el modo de acción, además de estudios moleculares que permitan entender como es la respuesta de los microorganismos ruminales ante la presencia de estos compuestos y cuáles son las poblaciones más susceptibles, esta información es necesaria para poder diseñar estrategias de mitigación más precisas.

Un uso estratégico de estas plantas dentro de los programas de nutrición de rumiantes en condiciones tropicales sería considerarlas como complemento a la dieta base de los animales, para suplir las deficiencias proteicas que comúnmente se encuentran bajo estas condiciones (Soliva et al., 2008; Leng, 1990). No obstante, para la especie *Enterolobium schomburgkii* se recomienda un nivel de inclusión inferior a 60 % para evitar disminuir la digestibilidad de la dieta, mientras que con *Senna occidentalis* es necesario considerar dosificaciones mucho más bajas a las evaluadas en este estudio para evitar la acumulación y desperdicio de nitrógeno por parte de los animales. Es de resaltar de que a pesar que la especie *Senna*

*occidentalis* ha sido considerada como tóxica en varias especies animales (Vashishtha et al., 2009), los resultados sugieren que en bajas dosificaciones sería posible incluir las hojas de esta planta en las dietas de rumiantes para incrementar el aporte de nutrientes sin afectar los parámetros de fermentación ruminal. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Campos (2014), en donde un consumo de las hojas de *Senna occidentalis* en dosis del 5 % del peso vivo en ovejas de aproximadamente 20 Kg, no provocó señales clínicas de intoxicación, posiblemente asociado a la baja presencia del compuesto tóxico en las hojas de esta planta.

Futuras investigaciones se requieren para evaluar el efecto de la inclusión de las plantas *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* en la dieta de rumiantes, con respecto al consumo, desempeño y bienestar animal.

### CONCLUSIONES

Este estudio permitió confirmar que dietas a base de *Brachiaria humidicola* con altos niveles de inclusión de las plantas *Enterolobium schomburgkii* y *Senna occidentalis* tienden a generar menores volúmenes de metano, los cuales están determinados por diferentes vías de acción. Dosificaciones de *Enterolobium schomburgkii* superiores a 60 % disminuyen la concentración de metano como consecuencia de una reducción en la degradación de la materia orgánica, mientras que en menores proporciones el efecto sobre la producción de metano persiste y no se afecta la concentración de los AGVT. Con *Senna occidentalis* los bajos niveles de metano estuvieron asociados con aumentos en la degradación del sustrato, amonio, valerato, isobutirato y AGVT. Al parecer, los menores volúmenes de metano encontrados con la adición de esta planta, estuvieron determinados principalmente por la fermentación de la fracción proteica de la dieta la cual incrementa los niveles de amonio del medio, no obstante, se generan menores volúmenes de gas y por lo tanto metano.

### Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira - Convocatoria del programa nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015.

### REFERENCIAS

- Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M. D. 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, 88, E. Suppl. E9-E21.
- Banik, B.K., Durmic, Z., Erskine, W., Ghamkhar, K., Revell, C. 2013. *In vitro* ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia. *Crop & Pasture Science*, 64: 935–942.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F., McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for entire methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 21-27.
- Bhatta, R. 2015. Reducing enteric methane emission using plant secondary metabolites. Chapter 17. V. Sejian et al. (eds.), *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*, DOI 10.1007/978-81-322-2265-1\_17
- Bhatta, R., Tajima, K., Kurihara, M. 2006. Influence of temperature and pH on fermentation pattern and methane production in the rumen simulating fermenter (RUSITEC). *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 19(3): 376-380.
- Blummel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77: 24–34.
- Bobayemi, OJ. 2006. Antinutritional factors, nutritive value and *in vitro* gas production of foliage and fruit of *Enterolobium cyclocarpum*. *World Journal of Zoology*, 1: 113 – 117.
- Bodas, R., López, S., Fernandez, M., Garcia-Gonzalez, R., Rodriguez, A. B., Wallace, R. J. Gonzalez, J.S. 2008 *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 245–258.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176:78– 93.
- Brouce, J. 2014. Production of Methane Emissions from Ruminant Husbandry: A Review. *Journal of Environmental Protection*, 5: 1482-1493.
- Campos, E. M. 2014. Intoxicação experimental por *Senna occidentalis* e *Senna obtusifolia* em ovinos. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, pp 8-31.
- Czerkawski, J. W. y Breckenridge, G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38: 371-384.
- Durmic, Z., Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health

- and welfare. *Animal Feed Science and Technology*, 176:150–162.
- Durmic, Z., Hutton, P., Revell, D.K., Emms, J., Hughes, S., Vercoe, P.E. 2010. *In vitro* fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 160: 98–109.
- Durmic, Z., Moate, P.J., Eckard, R., Revell, D.K., Williams, R., Vercoe, P.E. 2013. *In vitro* screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI:10.1002/jsfa.6396
- Ebrahimi, S.H., Mohini, M., Singhal, K.K., Miri, V.H., Tyagi, A.k. 2011. Evaluation of complementary effects of 9,10 anthraquinone and fumaric acid on methanogenesis and ruminal fermentation *in vitro*. *Archives of Animal Nutrition*, 65:4, 267-277. DOI: 10.1080/1745039X.2011.594345
- Ellis, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., Odongo, N.E., McBride, B.W., France, J. 2008. Modelling Animal Systems Paper: Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *Journal of Agricultural Science*, 146: 213–233.
- Flachowsky, G., Lebzien, P. 2012. Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 70–77.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., González, J.S. 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 36–52.
- García-Lopez, P. M., Kung Jr., L. Odom, J. M. 1996. *In vitro* Inhibition of Microbial Methane Production by 9,10-Anthraquinone. *Journal of Animal Science*, 74:2276–2284.
- Gemeda, B.S., Hassen, A. 2014. *In vitro* fermentation, digestibility and methane production of tropical perennial grass species. *Crop & Pasture Science*, 65, 479–488.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 111: 57–71.
- Hoover, W. H., Kincaid, C. R., Varga, G. A., Thayne, W. V., Junkins Jr, L. L. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *Journal of Animal Science*. 58(3):692-699.
- 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: 1–22
- Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C. 2015. Manipulation of Rumen Microbial Ecosystem for Reducing Enteric Methane Emission in Livestock. Chapter 16. V. Sejian et al. (eds.), *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*, DOI 10.1007/978-81-322-2265-1\_16
- Kebreab, E., Johnson, K.A., Archibeque, S.L., Pape, D., Wirth, T. 2008. Model for estimating enteric methane emissions from United States dairy and feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 86:2738-2748.
- Lee, C., Beauchemin, K. A. 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94: 557-570.
- Lee, H. J., Lee, S. C., Kim, J. D., Oh, Y. G., Kim, B. K., Kim, C. W., Kim, K. J. 2003. Methane production potential of feed ingredients as measured by *in vitro* gas test. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 16(8): 1143-1150.
- Leng, R.A. 1990. Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Reviews* 3.
- Leng, R.A. 2008. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. Report to Department of Climate Change, Commonwealth Government, Canberra, pp 1-90.
- Leng, R. A., Nolan, J. V. 1984. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, 67:1072-1089.
- Leng, R.A., Preston, T.R. 2010. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 22, Article #221. <http://www.lrrd.org/lrrd22/12/Leng22221.htm>
- Lenka, S., Lenka, N. K., Sejian, V., Mohanty, M. 2015. Contribution of agriculture sector to climate change. Chapter 3. V. Sejian et al. (eds.), *Climate change impact on livestock: adaptation and mitigation*, DOI 10.1007/978-81-322-2265-1\_3
- Li, X. 2013. *Eremophila glabra* reduces methane production in sheep. Doctoral thesis. The University of Western Australia, pp 14-17.

- Li, X., Durmic, Z., Liu, S., McSweeney, C.S., Vercoe, P.E. 2014. *Eremophila glabra* reduces methane production and methanogen populations when fermented in a Rusitec. *Anaerobe*, 29: 100-107.
- Liu, Q., Wang, C., Pei, C.X., Li, H.Y., Wang, Y.X., Zhang, S.L., Zhang, Y.L., He, J.P., Wang, H., Yang, W.Z., Bai, Y.S., Shi, Z.G., Liu, X.N. 2014. Effects of isovalerate supplementation on microbial status and rumen enzyme profile in steers fed on corn stover based diet. *Livestock Science*, 161:60-68.
- Makkar, H., Vercoe, P. 2007. Measuring methane production from ruminants. Joint FAO/IEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture, International Atomic Energy, Vienna, Austria, pp 1-137.
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S., Carro, M. D. 2010. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 93:3684-3698.
- Martínez, M.M., Del río, R., Flores, A., Martínez, R.E., Ron, O.A., Raya, D. 2012. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.: The biotechnological profile of a tropical tree. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11 (5): 385 - 399.
- McDougall E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal*, 43:99-109.
- Merino, P., Ramirez-Fanlo, E., Arriaga, H., Del Hierro, O., Artetxe, A., Viguria, M., 2011. Regional inventory of methane and nitrous oxide emission from ruminant livestock in the Basque Country. *Animal Feed Science and Technology*, 166- 167, 628- 640.
- Niderkorn, V., Macheboeuf, D. 2014. Identification of bioactive grassland plants for reducing enteric methane production and rumen proteolysis using an *in vitro* screening assay. *Animal Production Science*, 54: 1805-1809.
- Patra, A., Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71:1198-1222.
- Ribeiro, L.G., Machado, F.S., Campos, M.M., Guimaraes, R., Tomich, T.R., Reis, L.G. Coombs, C. 2015. Estrategias de mitigación de metano entérico en rumiantes: revisión de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28:124-143.
- Rodríguez, R., Fondevila, M., Castrillo, C. 2009. *In vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* CT-115 supplemented with four tropical browse legume species. *Animal Feed Science and Technology*, 151: 65 - 74.
- Romero-Pérez, A., Okine, E.K., Guan, L.L., Duval, S.M., Kindermann, M., Beauchemin, K.A. 2015. Effects of 3-nitrooxypropanol on methane production using the rumen simulation technique (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 209: 98-109.
- Russell, J.B. 2002. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, pp 1-120
- Satter, L. D., Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 32:199-208.
- Sirohi, S.K., Pandey, N., Mohini, M., Puniya, A.K., Singh, B., Kundu, S.S., Thube, H. 2011. Effect of monensin and anthraquinone supplementation on rumen fermentation and methane mitigation *in vitro*. *Indian Journal of Animal Sciences*, 81 (8): 859-863.
- Soliva, C.R., Zeleke, A.B., Clément, C., Hess, H.D., Fievez, V., Kreuzer, M. 2008. *In vitro* screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 53-71
- Storm, I.M., Hellwing, A., L., Nielsen, N.I., Madsen, J. 2012. Review: Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants, *Animals*. 2, 160-183.
- Ungerfeld, E.M. 2015. Shift in metabolic hydrogen sink in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*. 6 (37):1-17.
- Van Soest P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd. ed. Cornell University Press.
- Vashishtha, V.M., John, T.J., Kumar, A. 2009. Clinical & pathological features of acute toxicity due to *Cassia occidentalis* in vertebrates. *Indian Journal of Medical Research*, 130: 23-30.
- Vélez, O.M., Campos, R., Sánchez, H., Giraldo, L.A. 2017. Evaluación de diferentes niveles de inclusión de plantas nativas de sabanas inundables sobre una dieta basal de *Brachiaria humidicola* y su efecto sobre la producción de metano *in vitro*. *Archivos de Zootecnia*, 66 (255): 341-349.
- Vercoe, P.E., Durmic, Z., Revell, D.K. 2009. Rumen microbial ecology: helping to change landscape. *Nutritional and foraging of sheep and*

- goats. Options Méditerranéennes. A/ no. 85, pp 225-236.
- Wang, C., Liu, Q., Zhang, Y.L., Pei, C.X., Zhang, S.L., Wang, Y.X., Yang, W.Z., Bai, Y.S., Liu, X.N. 2010. Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99: 123–131.
- Wilkinson, J. M. 2012. Methane production by ruminants. *Livestock*. Vol 17.
- Yadav, J.P., Arya, V., Yadav, S., Panghal, M., Kumar, S., Dhankhar, S. 2010. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Fitoterapia*, 81: 223–230.
- Yang, C., Rooke, A.J., Cabeza, I., Wallace, R.J. 2016. Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Frontiers in Microbiology*. Vol 7(132):1-14.
- Yu, C.W., Chen, Y.S., Cheng, Y.H., Cheng, Y.S., Yang, C.M. J., Chang, C.T. Effects of fumarate on ruminal ammonia accumulation and fiber digestion *in vitro* and nutrient utilization in dairy does. *Journal of Dairy Science*, 93:701–710.