



Efecto de *Cymbopogon citratus* sobre la fermentación ruminal, producción de gas y metano *in vitro* †

[Effect of *Cymbopogon citratus* on *in vitro* ruminal fermentation, gas and methane production]

Reynaldo Zaragoza-Guerrero¹, María Fernanda Vázquez-Carrillo²,
Francisca Avilés Nova³, Manuel González-Ronquillo¹,
Cristian Cruz-Matías¹ and Octavio Alonso Castelán-Ortega^{1*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto Literario 100, colonia centro, C.P. 50000, Toluca, Estado de México. México. Email: Reylzar1@gmail.com, mrg@uaemex.mx, oacastelano@uaemex.mx *

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000. CU. Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Email: mvz.mafervazquez@gmail.com

³Centro Universitario Temascaltepec de la Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca - Tejupilco Km. 67.5, Barrio de Santiago, C.P. 51300 Temascaltepec de González, Estado de México, México. Email: favilesn@uaemex.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: Cattle are the primary source of methane (CH₄) in the agricultural sector; this gas is 28 times more potent at warming the atmosphere than carbon dioxide (CO₂). Therefore, it is necessary to develop mitigation strategies to reduce methane (CH₄) emissions. It has been shown that *Cymbopogon citratus* (CC) has antimethanogenic properties when used as a feed additive in cattle. **Objective:** The present study aimed to evaluate the effect of supplementing CC on cattle diets with a high proportion of low-quality forages on gas, CH₄ production, and dry matter digestibility (DMD). We evaluated the gas production volume (GP) from two basal diets supplemented with increasing levels of CC. A completely randomised factorial design (2 x 13) was used, where the forage type was maize straw (RM) and oat straw (PA). The CC supplementation levels were 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, and 6% of the diet on a dry matter (DM) basis. We measured the volume of GP and CH₄ produced (mLg⁻¹ DM) at 24 h and 48 h after the beginning of the incubation. We also measured the DMD at the end of the 48-hour incubation period. **Results:** Our results showed significant differences in both the type of forage ($p < 0.01$) and the level of CC supplementation ($p < 0.01$). A highly significant effect was also observed for the interaction between both factors ($p < 0.001$). RM produced significantly more gas than the PA ($p < 0.05$) and was more digestible ($p < 0.01$) too. Furthermore, RM produced more CH₄ than the PA ($p < 0.01$). CH₄ production was significantly reduced ($p < 0.01$) by supplementation with CC at 24 h post-incubation in both forages, by up to 40% and 21%, respectively. However, at 48 h post-incubation, CC reduced CH₄ production only in RM diets supplemented with 0.5, 1.5, and 5.5% CC. **Implications:** CC could be used in programs to reduce enteric CH₄. **Conclusions:** We concluded that the effect of CC on CH₄ production depends on the interaction between forage type and CC dose, with the most significant effect observed at 0.5 and 1.5% CC inclusion in the diet at 24 and 48 h of incubation.

Key words: climate change; mitigation; cattle; digestibility; herbs.

RESUMEN

Antecedentes: El ganado bovino es la fuente principal de emisiones de metano (CH₄) del sector agropecuario, este gas es 28 veces más potente que el dióxido de carbono (CO₂) para producir efecto invernadero y

† Submitted June 3, 2025 – Accepted August 27, 2026. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6372>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = R. Zaragoza-Guerrero: <https://orcid.org/0009-0006-7839-1971>; M.F. Vázquez-Carrillo: <https://orcid.org/0000-0002-8058-0580>; F. Avilés-Nova: <https://orcid.org/0000-0001-9353-9790>; M. González-Ronquillo: <https://orcid.org/0000-0003-3616-4157>; C. Cruz-Matías: <https://orcid.org/0009-0008-5096-1981>; O.A. Castelán-Ortega: <https://orcid.org/0000-0003-4693-9673>

calentamiento global, por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias de mitigación. El *Cymbopogon citratus* (CC) ha demostrado tener propiedades antimetanogénicas cuando se utiliza como aditivo en la alimentación del ganado bovino. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la suplementación con CC sobre la producción de gas (PG), CH₄ y digestibilidad *in vitro* de la dieta para ganado bovino alimentado con dietas altas en forrajes de baja calidad. **Metodología:** Se empleó un diseño factorial 2 x 13, donde los factores evaluados fueron: tipo de forraje, rastrojo de maíz (RM), y paja de avena (PA), nivel de suplementación con CC: 0.0, 0.5, 1.0, así hasta 6.0 % de la dieta en base seca (MS). El volumen de PG, y CH₄ se midió a las 24 h y 48 h de incubación, mientras que la digestibilidad de la materia seca (dMS) a 48 h. Los datos se analizaron con el software estadístico Minitab ver. 17 para efectos lineales y cuadráticos. **Resultados:** Encontramos diferencias significativas para el tipo de forraje ($p < 0.01$), nivel de suplementación ($p < 0.01$) con CC, y la interacción entre ambos factores ($p < 0.001$). El RM produjo más gas que la PA ($p < 0.01$), los tratamientos con este forraje fueron más digestibles ($p < 0.01$) y produjeron más CH₄ ($p < 0.01$) que los de PA. La producción de CH₄ se redujo significativamente ($p < 0.01$) por la suplementación con CC en ambos tratamientos a las 24 h, 40 % y 21 % respectivamente. Sin embargo, a las 48 h de incubación, sólo se observó reducción en la producción de CH₄ en las dietas con RM a los niveles de suplementación de CC 0.5, 1.5 y 5.5 %. **Implicaciones:** El CC podría ser usado en estrategias para reducir las emisiones de CH₄ entérico. **Conclusiones:** el efecto del CC sobre la producción de CH₄ dependió de la interacción tipo de forraje x dosis de CC, el efecto anti-metanogénico más alto fue a dosis de 0.5 y 1.5% de CC para las 24 y 48 h de incubación en ambos forrajes. **Palabras clave:** cambio climático; mitigación; ganadería bovina; digestibilidad; hierbas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el sector agropecuario contribuye con ~25 % de la producción antropogénica mundial de gases de efecto invernadero (GEI) (Gerber *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2016), entre los más importantes se encuentran el CO₂, CH₄ y óxido nítrico. A nivel global la ganadería contribuye con ~14.5% de las emisiones de GEI de origen antropogénico (Andrade *et al.*, 2024), y el 39% es CH₄ proveniente de la fermentación entérica del ganado bovino (Arbre *et al.*, 2016). Se estima que del 6 al 18% de la energía bruta (EB) consumida por los bovinos, se pierde en forma de CH₄ (Martínez-Muñoz *et al.*, 2022), el cual es liberado a la atmósfera vía el eructo y flatulencias y de esta forma contribuye al calentamiento global (DeRamus *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2011). El CH₄ es el segundo GEI más importante presente en la atmósfera, con un potencial para atrapar calor proveniente de la radiación solar 28 veces mayor que el del CO₂ y con un periodo de vida en la atmósfera de 9 – 15 años (Eckard, Grainger y de Klein, 2010). Los rumiantes domésticos producen grandes cantidades de CH₄, hasta 1000 L/día en vacas lecheras, dicho gas se origina mayormente por la fermentación del alimento dentro del rumen, en donde un tipo de microorganismos anaeróbicos altamente especializados, llamados *Arqueas* metanogénicas como *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* etc., las cuales utilizan el hidrógeno (H₂) producto de la fermentación y de la formación de ácidos grasos volátiles (AGVs), para reducir el exceso de H₂ en el rumen. El CH₄ producido de esta forma es posteriormente liberado al ambiente por el animal mediante el eructo y la respiración (Morgavi *et al.*,

2010), contribuyendo así al efecto invernadero y al calentamiento global.

Varios estudios han demostrado que la emisión de CH₄ por los bovinos está correlacionada con el consumo de alimento y composición de la dieta (Benaouda *et al.*, 2020; Ku-Vera *et al.*, 2020), por ejemplo, consumo elevado de forraje resulta en una mayor cantidad de CH₄ producido en el rumen, mientras que grandes cantidades de granos como maíz, sorgo, trigo disminuyen la producción de este gas (Homem *et al.*, 2017; Hellwing *et al.*, 2018; Hristov *et al.*, 2018). Esta relación está directamente asociada a la cantidad y proporción de AGVs producidos en el rumen, así, la elevada proporción de propionato formado durante la fermentación de carbohidratos no fibrosos habilita la captura de H₂ sin formar CO₂, evitando la síntesis de CH₄ por los metanógenos. Por otra parte, la producción de acetato y butirato libera CO₂ e H₂ promoviendo la formación de CH₄ en el rumen (Mitsumori y Sun, 2008a; Janssen, 2010). En esta forma, la elevada actividad de las bacterias metanogénicas se debe a una mayor disponibilidad de CO₂ e H₂ en el rumen, generados durante la fermentación de la fibra de los forrajes y la producción de acetato (Homem *et al.*, 2017). Los protozoarios ruminales también están involucrados en la producción de CH₄ de manera indirecta por su estrecha relación simbiótica con las arqueas metanogénicas en forma de ectosimbiosis o endosimbiosis, ya que existe un intercambio activo de H₂ entre estas especies (Khairunisa *et al.*, 2023). Por ejemplo, protozoarios como *Entodinium*, *Diplodinium* y *Isotricha* albergan arqueas metanogénicas endosimbióticas (principalmente *Methanobrevibacter smithii*), quienes utilizan el H₂ liberado por el protozoario para reducir CO₂ y

formar CH₄, es decir, se trata de una simbiosis metabólica: el protozooario mantiene su metabolismo estable y la arquea obtiene energía (Ungerfeld, 2020). Asimismo, los protozoarios al ser microorganismos anaerobios fermentativos, por su contribución significativa a la digestión de fibra, producen grandes cantidades de H₂, el cual es captado por las arqueas para reducirlo a CH₄ junto con el CO₂ (Guyader *et al.*, 2014).

Por todo lo anterior, optimizar el proceso de fermentación ruminal es crítico para disminuir la liberación de CH₄ a la atmósfera, mejorar la productividad de los rumiantes y mitigar el calentamiento global, ya que un animal que pierde menos energía como CH₄ es más productivo, incrementa la cantidad de carne y leche que produce por cada kilogramo de este gas emitido (Beauchemin *et al.*, 2020). La manipulación del ecosistema microbiano ruminal, a través de aditivos y suplementos de la dieta, es una de las estrategias de mitigación preferida por la comunidad científica por ser relativamente fácil de operar y su aplicación potencial a gran escala. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar aditivos alimenticios con el potencial antimetanogénico, que además de reducir la emisión de CH₄, no afecten la utilización de los nutrientes y el desempeño productivo del animal (Bhatta *et al.*, 2013), algunos ejemplos incluyen plantas taníferas y/o saponíferas y aceites esenciales (Wanapat *et al.*, 2008; Bhatta *et al.*, 2013; Petrič *et al.*, 2020; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2023; Cruz-Matías *et al.*, 2026). Los metabolitos secundarios, como los taninos, son particularmente atractivos como modificadores de la fermentación ruminal y, al ser productos de origen natural, son aceptados por los consumidores de leche y carne de bovinos, ya que son amigables con el medio ambiente y seguros para la salud de los rumiantes cuando se emplean a dosis adecuadas (Bhatta *et al.*, 2013). Así mismo, se ha demostrado que los aceites esenciales (AE) de las plantas también tienen una alta actividad biológica antimetanogénica observada mayormente *in vitro*, la cual va de 26 a 83% de inhibición, dependiendo del método de extracción del aceite (Patra, 2017), Bhatta *et al.*, 2013). Por ejemplo, Kumar *et al.*, (2009) evaluaron *in vitro* el efecto anti-metanogénico del aceite de eucalipto (*Eucalyptus L'Hér*) a un nivel de inclusión de 1.66 µL de AE/mL de medio de cultivo, encontrando que este aceite redujo la emisión de CH₄ hasta 56%. En un trabajo similar evaluaron *in vitro* una mezcla de tres tipos de aceites esenciales: ajwain (*Trachyspermum ammi*), ajo (*Allium sativum*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*), encontrando una actividad antimetanogénica del 22.1% a un nivel de inclusión de 1.33 microlitros de AE/mL de medio de cultivo (Kala *et al.*, 2017). De la misma

forma, Agarwal *et al.*, (2009); Singh *et al.*, (2018); Gallegos-Flores *et al.*, (2019) cuando utilizaron AE de té limón (*Cymbopogon citratus*) [CC]: 1.0 µL, aceite de menta (*Mentha piperita*): 2.0 µL y diferentes extractos de orégano: 0.1 y 1.0 µL, respectivamente, reportaron una reducción de la metanogénesis hasta en un 98.5%, acompañada de una disminución de la excreción de nitrógeno amoniacal. Ambos trabajos, si bien se vieron prometedores al reducir la producción de CH₄ conforme aumentaba el nivel de inclusión, también se observó que la digestibilidad del alimento disminuyó, es decir, la disminución en la emisión se dio a expensas de la digestibilidad, lo cual, como ya se mencionó, no es deseable para cualquier aditivo. Trabajos recientes en México evaluaron *in vivo* el efecto antimetanogénico de Miraflores (*Cosmos bipinnatus*) (Pineda *et al.*, 2018a) y *Cymbopogon citratus* (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2020a), en ganado bovino productor de leche y carne respectivamente, observando que *Cosmos bipinnatus* redujo el rendimiento de CH₄ (g CH₄/kg MS) en 16%, mientras que el CC en 33%, ambos fueron suministrados como aditivo. Estos autores también mencionan que el CC suplementado al 2% del consumo diario de materia seca (CMS) redujo significativamente la emisión diaria de CH₄ en 26% sin causar efectos negativos sobre el CMS y su desempeño productivo (Vázquez *et al.*, 2020). El efecto de CC como aditivo también fue evaluado en ganado de carne en Austria por Guggenberger (2021), en donde la adición de 100 g MS por animal por día de CC logró reducir significativamente ($P < 0.05$) la emisión de CH₄ en un 14.6%, descartando también la posibilidad de que esta cantidad de CC influya de manera negativa en el funcionamiento del rumen y la digestibilidad de la dieta. Sin embargo, tanto en el trabajo de Vázquez *et al.* (2020) como en el de Guggenberger (2021), no se evaluaron los efectos de CC en dietas basadas en forrajes de baja calidad, es decir, no sabemos si el efecto antimetanogénico del CC se mantiene en forrajes secos con alto contenido de fibra, que por naturaleza promueven una mayor emisión de CH₄. Tampoco, se ha determinado la dosis más efectiva de esta planta en este tipo de dietas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar, mediante la prueba de producción de gas (PG) *in vitro*, el efecto de niveles crecientes de inclusión de CC sobre la PG y la producción de CH₄ en dos dietas altas en forraje de mala calidad, y de esta forma determinar la dosis de CC con el mayor potencial antimetanogénico para su posterior evaluación *in vivo* en cámaras de respiración de circuito abierto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Ganadería, Medioambiente y

Energías Renovables (LABGAMA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, localizado a 19° 24' 15" de latitud norte y 99° 41' 06" de longitud oeste, a 2 632 msnm.

Animales y dieta

Se utilizaron cuatro bovinos hembra cruce de las razas Charolais × Holstein Friesian como donadores de líquido ruminal, con un peso promedio de 300±50 kg de peso vivo y 12 meses de edad. Los animales fueron alimentados con dos dietas altas en forraje de baja calidad, RM y PA, con una relación forraje:concentrado (F:C) de 61.4:38.6%. Los ingredientes del concentrado y los porcentajes de inclusión fueron: heno de alfalfa molido (7.3%), pasta de soya (2.9%), maíz molido (10.2%), desperdicio de panadería (12.4%) y salvado de trigo (5.8%). La composición química de los ingredientes de la dieta se muestra en la Tabla 1. La dieta se ofreció diariamente por la mañana, primero se ofreció el concentrado y después del forraje, con un periodo de adaptación de 21 días. La dieta experimental se formuló de acuerdo con los lineamientos de la (AFRC, Alderman y Cottrill, 1993) para reunir los requerimientos de proteína y energía metabolizable de mantenimiento.

Para las pruebas de producción de gas (PG) *in vitro*, se utilizó la técnica propuesta por Menke y Steingass (1988), en la que se emplearon jeringas de cristal marca Fortuna, Alemania, graduadas a 100 mL, en intervalos de 1 mL. Se utilizaron tres jeringas por tratamiento (tres repeticiones) y tres blancos en cada corrida. El buffer se preparó según el procedimiento descrito por Menke y Steingass, (1988) y se mantuvo en refrigeración listo para su uso con un día de anterioridad a cada corrida. La dieta utilizada para las incubaciones fue la misma

que se ofreció a los animales donadores de líquido ruminal, la cual se molió con un molino de alta velocidad (modelo Ginder T-series, China) a un tamaño de partícula de 2 mm. Para preparar el suplemento de CC se utilizaron sólo las hojas de la planta las cuales se adquirieron en verde en un mercado local, posteriormente se secó a la sombra durante 15 días en repisas hechas con malla metálica a 1 m de altura del piso, a una temperatura ambiente de 25 °C y una humedad relativa de 35%, esto para evitar la desnaturalización de sus metabolitos secundarios por la luz solar y la humedad. Una vez secas las hojas, se molieron hasta obtener un tamaño de partícula de 2 mm.

Prueba de producción de gas y tratamientos

El líquido ruminal se colectó por la mañana antes de ofrecer alimento a los animales donadores por medio de sondeo oroesofágico, el líquido se colocó en un termo previamente calentado a 39° C. Una vez obtenido el líquido ruminal se filtró por medio de cuatro capas de tela para queso y el filtrado se depositó en un matraz dentro de un baño María (DK-2000, Ecoshel, México) a 39° C, para posteriormente hacerle pasar CO₂ durante 15 minutos burbujeando previo a su utilización. A cada jeringa se le depositó por separado 200 mg de dieta control más la cantidad de CC suplementada de acuerdo con los niveles crecientes propuestos: 0 control, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 y 6 % (TM=0 a TM=12, y, TA=0 a TA=12) de la dieta, lo cual equivale a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 mg de CC. Estos niveles se eligieron para identificar el nivel óptimo de inclusión de CC, pero sin llegar a niveles muy altos que esta planta dejase de ser un aditivo y se convirtiese en un ingrediente mayor de la dieta, además de que su posible aplicación a gran escala sería muy difícil debido a los grandes volúmenes que necesitarían o bien posibles efectos negativos en el animal. La

Tabla 1. Composición química de los ingredientes utilizados en la formulación de las dos dietas experimentales, g/kg MS⁻¹.

Ingrediente	MS g ⁻¹	FDN g ⁻¹	FDA g ⁻¹	Cen g ⁻¹	MO g ⁻¹	PC g ⁻¹
Rastrojo de maíz	833	754.7	422.4	40.1	959.9	60
Paja de avena	923	572.2	254.5	58.4	941.6	69
Alfalfa	949.8	459.6	280	112	888	165
Salvado de trigo	911.4	467.7	113	46.7	953.3	162
Subproducto de panadería	968.4	272.6	30.4	12.5	987.5	76
Pasta de soya	936.9	135	35.5	69.2	930.8	435
Maíz molido	900.1	344.2	32.3	9.8	990.2	78
				TT g ⁻¹	TC g ⁻¹	
<i>C. citratus</i>	896.5	563.9	257.2	60.7	69	3.3

Clave: MS= materia seca, FDN= fibra detergente neutro, FDA= fibra detergente ácido, Cen= cenizas, MO= materia orgánica, PC= proteína cruda, TT= taninos totales, TC= taninos condensados.

composición química de las dietas experimentales se presenta en la Tabla 2. Posteriormente se agregaron a cada jeringa 30 mL de una mezcla de líquido ruminal y buffer según Menke y Steingass (1988), y después se colocaron en un baño María a 39 °C. La PG se midió registrando el desplazamiento del émbolo de la jeringa hacia arriba, estas lecturas se realizaron a intervalos de tiempo, primero a cada hora durante las primeras ocho horas, después a las 12, 16, 20, 24, 28, 36 y 48 horas. Para determinar la producción de CH₄ se tomó una muestra de 2 mL del gas en el espacio superior vacío de cada jeringa con la ayuda de una llave de tres pasos y otra jeringa de vidrio para cromatografía de gases (marca Hamilton®, USA) con capacidad de 60 mL. Antes de tomar la muestra de gas, cada jeringa de 100 mL se agitó cuidadosamente para mezclar el gas existente en el interior, después se liberó la mayor parte hasta dejar ~6 mL, de los cuales se tomaron tres muestras de 2 mL. Posteriormente, cada muestra de gas se hizo pasar lentamente por un detector de CH₄ (marca PHG100, PANGAEA, China, rango de medición: hasta 50,000 ppm o 100 % LEL). Por último, se registraron los tres resultados de cada jeringa en partes por millón (ppm) y se calculó el promedio. La concentración de CH₄ en las jeringas se midió a las 24 y 48 horas después de iniciada la

incubación, y se reporta la producción acumulada de CH₄ al igual que de PG. Cumplidas las 48 horas, se terminó la incubación en el baño María y, posteriormente, se filtró el contenido de cada jeringa para separar la parte sólida de la líquida y así determinar la digestibilidad del sustrato. Se utilizó la técnica de filtrado al vacío, para ello utilizamos un sistema de filtración el cual consiste en un matraz Kitasato de 500 mL (marca StonyLab, USA), una bomba de vacío, marca Vacuum stick, Filtr8™, China, conectada al matraz, adaptadores de goma de forma cónica para sellar el espacio entre el matríz y los crisoles filtrantes de vidrio de poro medio y capacidad de 30 mL de marca Sibata, Taiwan. El filtrado resultante en el crisol se pesó en base fresca en una báscula electrónica de precisión (marca WPB 3K, Weighing Inspecting & Marking, USA). Posteriormente, los crisoles se pusieron a secar dentro de una estufa de aire forzado (modelo 9023A, ECOSHEL, México) a una temperatura de 60 °C durante 72 h. Después, los crisoles se retiraron de la estufa y se registró el peso de cada uno para finalmente determinar la digestibilidad del sustrato, o digestibilidad de la MS (dMS) a través de la siguiente fórmula: dMS= (peso fresco del filtrado - peso seco del seco del filtrado/peso seco de la muestra) * 100.

Tabla 2. Composición química de las dietas experimentales: tratamiento con maíz (TM) y tratamiento con avena (TA), g/kg MS⁻¹.

CC, mg	MS g ⁻¹		FDN g ⁻¹		FDA g ⁻¹		Cen g ⁻¹		MO g ⁻¹		PC g ⁻¹	
	TM	TA	TM	TA	TM	TA	TM	TA	TM	TA	TM	TA
0	91.2	93.6	456.0	403.0	261.0	225.0	61.4	149.8	938.6	850.2	141.0	144.0
1	91.2	93.6	460.8	412.5	268.7	258.8	64.8	150.7	935.2	849.3	141.0	144.0
2	91.2	93.6	480.5	419.0	299.5	269.5	66.5	151.2	933.5	848.8	141.0	144.0
3	91.2	93.6	469.8	447.2	277.1	247.3	66.1	153.7	934.0	846.4	141.0	144.0
4	91.2	93.6	487.3	441.5	289.4	260.3	69.3	153.9	930.7	846.1	141.0	144.0
5	91.2	93.6	473.1	449.1	277.3	238.0	70.5	154.6	929.5	845.5	141.0	144.0
6	91.2	93.6	501.0	461.7	296.1	242.6	68.3	154.7	931.7	845.3	141.0	144.0
7	91.2	93.6	510.7	465.0	302.3	268.7	71.6	155.4	928.4	844.6	141.0	144.0
8	91.2	93.6	515.9	460.7	297.6	252.0	71.6	155.0	928.4	845.0	141.0	144.0
9	91.2	93.6	498.7	459.6	293.4	250.0	72.0	155.7	928.0	844.4	141.0	144.0
10	91.2	93.6	521.1	452.0	313.3	269.4	70.5	156.5	929.6	843.6	141.0	144.0
11	91.2	93.6	520.0	451.2	286.7	280.6	69.7	157.2	930.4	842.9	141.0	144.0
12	91.2	93.6	530.5	482.0	296.0	271.2	74.5	160.2	925.5	839.8	141.0	144.0

Clave: FDN= fibra detergente neutro, FDA= fibra detergente   cido, Cen= cenizas, MO= materia orgánica, PC= proteína cruda, TM= tratamiento con rastrojo de maíz, TA= tratamiento con paja de avena

Diseño experimental y análisis de resultados

Se usó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 13 en donde el tipo de forraje y los niveles de adición de CC fueron los factores principales de acuerdo con el siguiente modelo lineal general: $Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + (T_i * B_j) + \varepsilon_{ij}$ donde Y_{ij} es la variable de respuesta, μ el promedio general, T_i el tipo de forraje ($i=1=RM, 2=PA$), B_j el nivel de inclusión de CC ($j=1...13$), y $(T_i * B_j)$ la interacción entre el tipo de forraje por el nivel de inclusión de CC, y ε_{ij} el error residual del i ésimo forraje y el j ésimo nivel de inclusión. Los resultados fueron analizados a través de un análisis de varianza para un diseño factorial empleando el programa Minitab versión 14, para el cálculo de los contrastes lineales y cuadráticos se utilizó el software JMP Pro versión 17. Cuando se encontraron diferencias entre medias, se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de confianza de 95% o mayor.

RESULTADOS

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la PG acumulada y de CH_4 a las 24 y 48 h, y la dMS a las 48 h. Se observó una interacción significativa ($p < 0.01$) entre el tipo de forraje utilizado y el nivel de inclusión de CC para la PG a las 24 y 48 h, y para la producción de CH_4 ($p < 0.001$). Debido a que el efecto de la interacción entre el tipo de forraje y el nivel de CC fue altamente significativa, nos concentramos en describir y discutir este resultado en la siguiente sección. El RM produjo significativamente más gas que la PA a las 24 y 48 h ($p < 0.01$). Para ambos forrajes el efecto de la inclusión de CC en los diferentes niveles presentó una respuesta cuadrática en la PG a las 24 y 48 h ($p < 0.0001$). Por ejemplo, los tratamientos TM2 al TM4 incrementaron significativamente la PG a las 24 h, ($p < 0.01$), mientras que los tratamientos TM7 al TM12 disminuyeron significativamente la PG ($p < 0.01$). Para el caso de los tratamientos con PA se observó que el tratamiento TA10 redujo la PG a las 24 h, ($p < 0.01$), con respecto a los demás tratamientos. No se observaron efectos significativos para el resto de los tratamientos ($p > 0.05$), de este grupo. De manera similar, el TA8 redujo la PG a las 48 h ($p < 0.01$), sin observarse

diferencias significativas para los demás tratamientos.

Para el caso de la dMS, se observó una respuesta cuadrática ($p < 0.0001$) y una interacción significativa ($p < 0.01$) entre el tipo de forraje y el nivel de inclusión de CC; es decir la digestibilidad observada fue el resultado de la interacción entre el efecto del tipo de forraje y del nivel de inclusión de CC. La Tabla 3 muestra que la dMS para el caso del RM disminuyó ($p < 0.01$) entre el tratamiento control, TM0, y el TM6, pero posteriormente aumentó en forma significativa ($p < 0.01$), sin embargo, este comportamiento no se observó en los tratamientos con PA, pues esta disminuyó a partir del TA6 ($p < 0.01$). Por otro lado, se observó que la dMS fue en promedio 9% mayor en los tratamientos con RM que con PA ($p < 0.01$). La respuesta cuadrática ($p < 0.0001$), indica que niveles crecientes de CC no resultaron en un incremento o decremento lineal de la digestibilidad. Con respecto a la producción de CH_4 se observó también una interacción significativa ($p < 0.001$) entre el tipo de forraje y el nivel de inclusión de CC, y una respuesta cuadrática, es decir, niveles crecientes de CC no necesariamente resultaron en una menor producción de CH_4 , $p < 0.0001$, y la producción de CH_4 no fue similar entre forrajes. La producción de CH_4 fue más alta a las 24 y 48 h ($p < 0.01$) en los tratamientos con RM, por ejemplo, a las 24 h de incubación la producción de CH_4 promedio para todos los tratamientos con RM es 37% más alta que en los tratamientos con PA, mientras que a las 48 h es 40% más alta (Tabla 3). La menor producción acumulada de CH_4 a las 48 h de fermentación se observa en el nivel seis de inclusión para ambos forrajes, 17% y 13.2% menos para RM y PA, respectivamente. La Figura 1 presenta la relación entre el promedio general de la dMS y la producción promedio de CH_4 para ambos forrajes juntos, se observa que la menor emisión de CH_4 está en el nivel seis de inclusión del CC, y que la producción de este gas siguió un comportamiento similar a la digestibilidad. Es decir, una disminución en la dMS se acompañó en una menor producción de CH_4 y por el contrario un aumento resultó en una mayor producción de este gas.

Tabla 3. Producción de gas (PG) y producción de metano (CH₄) a las 24 y 48 h de incubación y digestibilidad de la materia seca a las 48 h para las dietas con rastrojo de maíz y paja de avena con niveles crecientes de CC.

Tratamiento con CC mg	PG 24 h mL g ⁻¹ MS	CH ₄ 24 h mL g ⁻¹ MS	PG 48 h mL g ⁻¹ MS	CH ₄ 48 h mL g ⁻¹ MS	Digestibilidad g kg ⁻¹ MS
Rastrojo de maíz					
TM0	258.1 ^a	126.1 ^a	328.8 ^a	156.4 ^a	612.5 ^a
TM1	255.0 ^a	122.8 ^a	331.7 ^a	137.9 ^b	516.7 ^b
TM2	266.9 ^b	136.4 ^b	344.4 ^b	147.1 ^a	533.3 ^b
TM3	270.8 ^b	116.0 ^b	330.0 ^a	138.4 ^b	550.0 ^b
TM4	278.9 ^a	130.6 ^a	345.8 ^b	153.3 ^a	550.0 ^b
TM5	267.5 ^a	127.2 ^a	340.0 ^a	146.2 ^a	550.0 ^b
TM6	260.3 ^a	116.3 ^b	327.5 ^a	129.8 ^b	533.3 ^b
TM7	230.8 ^b	100.1 ^b	310.0 ^b	142.3 ^a	600.0 ^a
TM8	231.7 ^b	102.8 ^b	311.3 ^b	141.0 ^a	600.0 ^a
TM9	227.7 ^b	75.2 ^b	306.7 ^b	148.1 ^a	633.3 ^a
TM10	231.7 ^b	95.1 ^b	304.2 ^b	170.4 ^a	616.7 ^a
TM11	230.0 ^b	101.0 ^b	300.0 ^b	136.9 ^b	600.0 ^a
TM12	220.0 ^b	75.6 ^b	293.8 ^b	142.0 ^a	600.0 ^a
EEDif	0.6	2.4	3.6	4.7	6.0
Paja de avena					
TA0	215.8 ^a	45.1 ^a	270.4 ^a	57.4 ^a	550.0 ^a
TA1	215.0 ^a	45.1 ^a	275.0 ^a	53.7 ^a	600.0 ^b
TA2	213.3 ^a	44.7 ^a	273.5 ^a	52.1 ^a	525.0 ^b
TA3	215.0 ^a	45.4 ^a	271.7 ^a	51.6 ^a	550.0 ^a
TA4	210.8 ^a	44.3 ^a	270.8 ^a	51.1 ^a	550.0 ^a
TA5	215.0 ^a	45.9 ^a	275.8 ^a	53.0 ^a	550.0 ^a
TA6	210.8 ^a	44.5 ^a	270.0 ^a	49.8 ^a	500.0 ^b
TA7	215.8 ^a	35.1 ^b	276.7 ^a	68.9 ^b	450.0 ^b
TA8	219.2 ^a	37.7 ^b	281.7 ^b	71.5 ^b	516.7 ^b
TA9	210.0 ^a	34.4 ^b	275.0 ^a	69.5 ^b	500.0 ^b
TA10	205.8 ^b	33.8 ^b	265.2 ^a	61.5 ^a	516.7 ^b
TA11	217.5 ^a	38.2 ^b	273.3 ^a	66.8 ^b	450.0 ^b
TA12	216.7 ^a	38.7 ^b	274.2 ^a	66.2 ^b	550.0 ^a
EEDif	2.2	1.1	2.9	2.3	4.3
Nivel de probabilidad, P					
Efecto forraje	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Efecto nivel de suplementación	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Interacción	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Contraste lineal	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Contraste cuadrático	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

0 control, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 y 6 %, TM= tratamientos con rastrojo de maíz, TA= tratamientos con paja de avena., literales diferentes entre renglones difieren significativamente, ($p < 0.01$), EEDif= error estándar de la diferencia

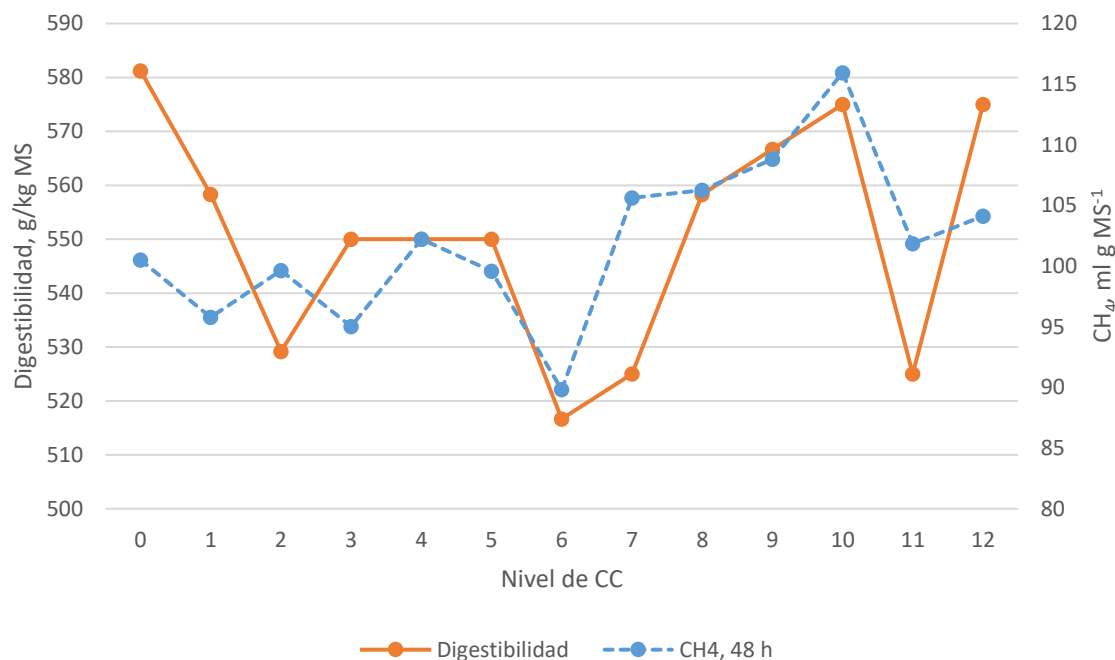


Figura 1. Relación entre el promedio general de la digestibilidad de la materia seca (dMS) y la producción promedio de CH₄ para ambos forrajes juntos en los 12 niveles de inclusión de *Cymbopogon citratus*.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados para la elevada producción de CH₄ a partir del RM se pueden explicar por su alto contenido de fibra y baja calidad, expresada por su baja digestibilidad, posiblemente debido a su alto contenido de lignina (Pal, Patra y Sahoo, 2015), por lo tanto, se puede señalar que el RM es una fuente importante de CH₄ una vez fermentado en el rumen como se demuestra en el presente trabajo en donde la producción de CH₄ es más de dos veces la de PA. Este hallazgo es relevante para la ganadería bovina de los valles altos del centro de México en donde el RM es un forraje muy utilizado en la alimentación del ganado (Ambriz-Vilchis *et al.*, 2009). Altos volúmenes de producción de CH₄ en ganado bovino alimentado con RM también han sido reportados por Benaouda *et al.*, (2024), es por ello la importancia de conocer el volumen de producción de CH₄ a partir del RM, así como las opciones de mitigación, ya que no es factible que los ganaderos dejen de utilizarlo en el corto plazo, pues se trata de sistemas mixtos de producción de maíz-ganado en donde la producción de maíz para consumo humano es fuente de forraje para el ganado (Estrada-Flores *et al.*, 2006), por lo que el uso de aditivos como el CC se presentan como una opción sustentable de manejo de emisiones de CH₄ en situaciones en donde no es posible comprar aditivos comerciales antimetanogénicos. La PG más alta en el RM se debe a su mayor contenido de paredes celulares fermentables tanto en los tallos

como en toda la planta, lo cual se observa por un mayor contenido de FDN y proporcionalmente la misma cantidad de FDA (Tabla 2), resultando en una dMS más alta que la PA (Tabla 3). El gas (principalmente CO₂) y el CH₄ son producidos cuando la hemicelulosa primero, y la celulosa después, son fermentadas a acetato y butirato, mientras que la fermentación del sustrato a propionato produce gas únicamente cuando el pH está amortiguado y, por lo tanto, una producción relativamente baja de CH₄ está asociada con la producción de propionato (actúa como sumidero de H₂), además de que este compuesto se produce principalmente a partir de la fermentación los carbohidratos solubles en agua y rápidamente fermentables (Mackie *et al.*, 2023, Van Soest, Robertson y Lewis, 1991). Por lo tanto, esperábamos una mayor producción de CH₄ en las dietas con RM sobre todo a las 48 h de fermentación, como efectivamente ocurrió, así mismo, se observó que la producción de CH₄ a las 24 h disminuyó conforme aumentaba el nivel de inclusión de CC tanto en el tratamiento con RM como con PA, sugiriendo un efecto antimetanogénico del CC en las primeras horas de fermentación ruminal del alimento. Sin embargo, se observó que el efecto antimetanogénico del CC en ambos forrajes ocurre a expensas de una reducción en la digestibilidad de hasta 10% en promedio, y la mayor reducción se observa en el nivel de inclusión 6 (Figura 1) a las 48 h de fermentación, el cual representa un nivel de

inclusión del 2.5% del CMS de la dieta. Es decir, menor fermentación resulta menos producción de acetato y butirato y menos liberación de H_2 por lo tanto menos CH_4 se sintetiza en el rumen (Parnian-Khajehtizaj *et al.*, 2023). Por otro lado, es posible que el aumento en la producción de CH_4 a partir del nivel 7 de inclusión de CC (3% del CMS) se deba al aporte extra de fibra proveniente del CC a niveles altos de inclusión, ya que el CC también es una gramínea y por tanto aporta FDN a la dieta, el cual pudo tener un efecto positivo sobre la dMS y superior al efecto antimetanogénico de los compuestos secundarios en el CC. La disminución en la producción de CH_4 observada en el presente estudio, sobre todo en las primeras 24 h de fermentación, es comparable con varios trabajos realizados *in vitro*, donde se han evaluado diferentes extractos y aceites de plantas, entre ellos el CC. Por ejemplo, Agarwal *et al.*, (2009) redujeron en 19.9, 46 y 75% la producción de CH_4 a niveles de inclusión de 0.3, 1.0 y 2.0 μL de aceite de menta (*Mentha piperita*), pero esta reducción fue el resultado de una disminución en la actividad de la xilanasa y la carboximetilcelulasa microbianas acompañada de una disminución en la digestibilidad asociada a niveles crecientes de aceite esencial de menta, similar a lo ocurrido en el presente estudio. También Singh *et al.*, (2018) utilizando aceite de CC en niveles de inclusión de 10, 20, 40, 80 mL, redujeron linealmente el porcentaje de CH_4 en el gas producido ($p < 0.01$) conforme aumentaba la concentración de aceite de CC, sin embargo, en el presente estudio no se observó una respuesta lineal sino cuadrática probablemente porque se utilizó la planta completa y no sólo aceite esencial. En este sentido, planteamos la hipótesis de que la reducción en la producción de CH_4 a las primeras 24 h, observada en el presente estudio, podría atribuirse a dos eventos: primero a los taninos condensados presentes en el CC como los principales causantes del efecto anti-metanogénico ($>6\%$) (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2020a; Guggenberger, 2021), y, segundo, a que en las primeras horas de incubación la fermentación sigue la ruta del ácido propiónico por la degradación de los carbohidratos no estructurales en el concentrado de la dieta experimental (Mitsumori y Sun, 2008b), por tanto la producción de CH_4 fue menor, en tanto que la degradación de la fibra ocurrió mayormente a partir de las 48 h, y por lo tanto se observó una mayor producción acumulada de CH_4 . De acuerdo con (Patra, 2017), los taninos condensados reducen la producción de CH_4 en rumen indirectamente disminuyendo la producción de H_2 por una disminución en la digestión de la fibra llevada a cabo por los protozoarios, lo cual posiblemente ocurrió en el presente estudio. En este sentido, es importante mencionar que la reducción en la

producción de CH_4 a las 24 h, principalmente en la dieta con RM, pudiera atribuirse también a que el número de protozoarios ruminales disminuye por la acción de las propiedades antimicrobianas de los metabolitos secundarios presentes en el CC, en particular los taninos condensados, (Nambiar y Matela, 2012; Olorunnisola *et al.*, 2014), ya que estos microorganismos están en estrecha relación simbiótica con las bacterias metanogénicas, así que al reducir la población de los protozoarios, se afecta indirectamente la producción de CH_4 por las bacterias metanogénicas (Vogels, Hoppe y Stumm, 1980; Bhatta *et al.*, 2009). Las concentraciones relativamente altas de TT y TC que se muestran en la Tabla 1 sugieren que esta puede ser una explicación plausible.

Sin embargo, el comportamiento en la producción de CH_4 fue diferente a las 48 h de incubación, tanto en la dieta con RM como con la dieta con PA, ya que, a este tiempo de incubación, la producción de CH_4 se redujo sólo a dosis bajas de inclusión de CC en la dieta con RM, pero en la dieta con PA aumentó la producción de CH_4 conforme aumentaba el nivel de inclusión de CC. Este comportamiento se debió a la reducción en la digestibilidad como ya se mencionó arriba, probablemente debido a que el CC es un forraje, y contiene una razonable cantidad de polisacáridos estructurales en forma de fibra (FDN y FDA), como se muestra en la Tabla 1., así que conforme el nivel de inclusión de CC aumentó gradualmente en el medio de incubación existió también una mayor cantidad de fibra disponible: por ejemplo, en el caso del RM la FDN aumentó 14% entre TM0 y TM12, mientras que para PA aumento 16%. Adicionalmente, era de esperarse que las fracciones más insolubles de la fibra, como la celulosa, empezaran a degradarse después de las primeras 24 h. Así mismo, es posible que la actividad anti-metanogénica del CC disminuya a medida que los taninos se van fijando a las proteínas de la dieta y a la fibra. De esta forma, no es extraño que la producción más alta de CH_4 se dé en el mayor tiempo de incubación cuando la actividad biológica de los taninos posiblemente disminuyó y la degradación de la celulosa se incrementó. Sin embargo, este comportamiento deberá evaluarse midiendo las concentraciones de taninos a las 24 y 48 h. Por otro lado, es posible que la alta actividad de las bacterias metanogénicas se deba posiblemente a la gran disponibilidad de CO_2 e H_2 , los cuales se forman durante la producción de acetato por la fermentación de la fibra (Van Soest, Robertson y Lewis, 1991b) (Homem *et al.*, 2017). Finalmente, es posible decir que el efecto anti-metanogénico deseado se encontró a dosis bajas (entre los niveles de inclusión de 1 y 6 o hasta el 2.5 % del CMS) de CC tanto a las 24 h como a las

48 h, este efecto lo reportan también varios trabajos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* donde utilizando plantas como aditivos antimetanológicos naturales redujeron de manera significativa la liberación de metano ruminal (Chanthakhoun, Wanapat y Berg, 2012; Mohamed Gomaa *et al.*, 2017; Pineda *et al.*, 2018b; Vázquez-Carrillo *et al.*, 2020b; Guggenberger, 2021). Finalmente, el caso del RM la disminución se dio también a expensas de la digestibilidad, lo cual no es una característica deseable para un aditivo antimetanológico, pues podría resultar en una disminución en el aporte de nutrientes al animal.

CONCLUSIONES

Es posible concluir que el RM produce más CH₄ que la PA y que el uso de CC *in vitro* reduce las emisiones de CH₄ cuando se emplea en niveles de hasta 2.5% del CMS, sin embargo, este efecto puede ser a expensas de una disminución moderada en la digestibilidad. Por lo tanto, una forma de reducir las emisiones de CH₄ es suplementar al ganado bovino con CC a dosis bajas para no afectar la digestibilidad e de la dieta, lo cual permitiría a los ganaderos seguir utilizando el RM como un forraje de gran utilidad a la par de ayudar a mitigar el cambio climático.

Funding. The authors acknowledge financial support for conducting the present work from the Autonomous University of the State of Mexico, grant number UAEM 6511/2022CIB, and the Ministry of Science, Humanities, Technology and Innovation of Mexico (SECIHTI) for the master of Science studies grant to the first author. Partial funding to conclude the present work from SECIHTI, grant number 317413, is also acknowledged.

Conflict of Interest Statement. The authors of this work declare that they have no conflict of interest with the institution or with any individual associated with the preparation, review, or publication of the proposed manuscript. All authors confirm that there are no financial, personal, or professional relationships that could be construed as influencing the content of this paper.

Compliance with ethical standards. Due to its characteristics, this study does not require the approval of a bioethics committee.

Data availability. Data are accessible through the corresponding author Octavio Alonso Castellán-Ortega

Author contribution statement (CRediT). O.A. Castellán-Ortega – Conceptualization, Funding

acquisition, Project Administration, Review and Editing of Manuscript., M. González-Ronquillo – Supervision, Validation., M.F. Vázquez-Carrillo – Supervision, Investigation., C. Cruz-Matías – Investigation., R. Zaragoza-Guerrero – Investigation, Data Curation, Formal Analysis Writing Original Draft., F. Avilés-Nova-Validation, Resources, Supervision.

REFERENCES

- AFRC, Alderman, G. and Cottrill, B.R., 1993. Energy and protein requirements of ruminants: an advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, UK: CAB International.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. and Kamra, D.N., 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, [online] 148(2), pp.321–327. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.04.004>
- Ambriz-Vilchis, V., Estrada-Flores, J.G., Hernández-Ortega, M., Rojas-Garduño, M. de los A. and Castellán-Ortega, O.A., 2009. Development of Feeding Strategies for Cows in Small Scale Dairy Farming Systems in the Highlands of Central Mexico by a Simulation Model and On-Farm Experiments. Phase II: On-farm Experiments and Validation of a Simulation Model. In: W. Cao, J.W. White and E. Wang, eds. *Crop Modeling and Decision Support*. Berlin, Heidelberg: Springer. pp.249–257. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01132-0_26
- Andrade, H.J., Vega, A., Martínez-Salinas, A., Villanueva, C., Jiménez-Trujillo, J.A., Betanzos-Simon, J.E., Pérez, E., Ibrahim, M. and Sepúlveda L, C.J., 2024. The carbon footprint of livestock farms under conventional management and silvopastoral systems in Jalisco, Chiapas, and Campeche (Mexico). *Frontiers in Sustainable Food Systems*, [online] 8. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1363994>
- Arbre, M., Rochette, Y., Guyader, J., Lascoux, C., Gómez, L.M., Eugène, M., Morgavi, D.P., Renand, G., Doreau, M. and Martin, C., 2016. Repeatability of enteric methane

- determinations from cattle using either the SF6 tracer technique or the GreenFeed system. *Animal Production Science*, [online] 56(3), pp.238–243. <https://doi.org/10.1071/AN15512>
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J. and Wang, M., 2020. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, [online] 14, pp.s2–s16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Benaouda, M., González-Ronquillo, M., Appuhamy, J.A.D.R.N., Kebreab, E., Molina, L.T., Herrera-Camacho, J., Ku-Vera, J.C., Ángeles-Hernández, J.C. and Castelán-Ortega, O.A., 2020. Development of mathematical models to predict enteric methane emission by cattle in Latin America. *Livestock Science*, [online] 241, p.104177. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104177>
- Benaouda, M., González-Ronquillo, M., Avilés-Nova, F., Zaragoza-Guerrero, R., Ku-Vera, J.C. and Castelán-Ortega, O.A., 2024. Use of Increasing Levels of Low-Quality Forage in Dairy Cows' Diets to Regulate Enteric Methane Production in Subtropical Regions. *Methane*, [online] 3(1), pp.149–159. <https://doi.org/10.3390/methane3010009>
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K. t. and Prasad, C. s., 2013. Effect of plant secondary compounds on in vitro methane, ammonia production and ruminal protozoa population. *Journal of Applied Microbiology*, [online] 115(2), pp.455–465. <https://doi.org/10.1111/jam.12238>
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M., 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, [online] 92(11), pp.5512–5522. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1441>
- Chanthakhoun, V., Wanapat, M. and Berg, J., 2012. Level of crude protein in concentrate supplements influenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Livestock Science*, [online] 144(3), pp.197–204. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.11.011>
- Cruz-Matías, C., Avilés-Nova, F., Nahed-Toral, J., Herrera-Camacho, J., Trujillo-Vázquez, R.J., González-Ronquillo, M. and Castelán-Ortega, O.A., 2026. Use of Tropical Legume Tree and Coffee Pulp to Reduce Enteric Methane Emission by Cattle Fed a Low-Quality Forage Diet. *Agriculture*, [online] 16(2), p.153. <https://doi.org/10.3390/agriculture16020153>
- DeRamus, H.A., Clement, T.C., Giampola, D.D. and Dickison, P.C., 2003. Methane Emissions of Beef Cattle on Forages. *Journal of Environmental Quality*, [online] 32(1), pp.269–277. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.2690>
- Eckard, R.J., Grainger, C. and de Klein, C.A.M., 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, [online] 130(1), pp.47–56. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.010>
- Estrada-Flores, J.G., González-Ronquillo, M., Mould, F.L., Arriaga-Jordán, C.M. and Castelán-Ortega, O.A., 2006. Chemical composition and fermentation characteristics of grain and different parts of the stover from maize land races harvested at different growing periods in two zones of central Mexico. *Animal Science*, [online] 82(6), pp.845–852. <https://doi.org/10.1017/ASC2006094>
- Gallegos-Flores, P., Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Meza-López, C. and Rodríguez-Tenorio, D., 2019. Evaluación diferencial de extractos de orégano en la producción de ácidos grasos volátiles y metano durante fermentación ruminal in vitro. *Abanico Veterinario*, [online] 9(0). Available at: <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-veterinario/article/view/183> [Accessed 9 July 2026].
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J. and Tempio, G., 2013. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities.

- Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Guggenberger, T., 2021. Abschlussbericht Lemongras. Available at: https://raumberg-gumpenstein.at/downloads/FODOK/2021/fodok_1_24993_abschlussbericht_lemongras.pdf [Accessed 8 August 2026].
- Guyader, J., Eugène, M., Nozière, P., Morgavi, D.P., Doreau, M. and Martin, C., 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal*, [online] 8(11), pp.1816–1825. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001852>
- Hellwing, A.L.F., Lund, P., Mogensen, L. and Vestergaard, M., 2018. Growth, feed intake, methane emissions and carbon footprint from Holstein bull calves fed four different rations. *Livestock Science*, [online] 214, pp.51–61. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.05.003>
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P., Thornton, P.K., Conant, R.T., Smith, P., Wiersma, S., Hristov, A.N., Gerber, P., Gill, M., Butterbach-Bahl, K., Valin, H., Garnett, T. and Stehfest, E., 2016. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, [online] 6(5), pp.452–461. <https://doi.org/10.1038/nclimate2925>
- Homem, J.A.C., Bertocco, E.J.M., Ruiz, F.V., Costa, A.M.T., Regina, J.P., Pastori, D.A., Barbosa, D.V., Faleiros, N.B. and Fernandes, C.L., 2017. Methane production by in vitro ruminal fermentation of feed ingredients. *Semina: Ciências Agrárias*, [online] 38(2), pp.877–884. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n2p877>
- Hristov, A.N., Kebreab, E., Niu, M., Oh, J., Bannink, A., Bayat, A.R., Boland, T.M., Brito, A.F., Casper, D.P., Crompton, L.A., Dijkstra, J., Eugène, M., Garnsworthy, P.C., Haque, N., Hellwing, A.L.F., Huhtanen, P., Kreuzer, M., Kuhla, B., Lund, P., Madsen, J., Martin, C., Moate, P.J., Muetzel, S., Muñoz, C., Peiren, N., Powell, J.M., Reynolds, C.K., Schwarm, A., Shingfield, K.J., Storlien, T.M., Weisbjerg, M.R., Yáñez-Ruiz, D.R. and Yu, Z., 2018. Symposium review: Uncertainties in enteric methane inventories, measurement techniques, and prediction models. *Journal of Dairy Science*, [online] 101(7), pp.6655–6674. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13536>
- 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*, [online] 160(1), pp.1–22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2010.07.002>
- Kala, A., Kamra, D.N., Agarwal, N. and Chaudhary, L.C., 2017. Effect of a Blend of Essential Oils on Buffalo Rumen Microbial and Enzyme Profiles and In Vitro Feed Fermentation. *Animal Nutrition and Feed Technology*, [online] 17(2), pp.189–200. Available at: <https://indianjournals.com/article/anft-17-2-001> [Accessed 9 July 2026].
- Khairunisa, B.H., Heryakusuma, C., Ike, K., Mukhopadhyay, B. and Susanti, D., 2023. Evolving understanding of rumen methanogen ecophysiology. *Frontiers in Microbiology*, [online] 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1296008>
- Kumar, R., Kamra, D.N., Agarwal, N. and Chaudhary, L.C., 2009. Effect of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) Oil on in vitro Methanogenesis and Fermentation of Feed with Buffalo Rumen Liquor. *Animal Nutrition and Feed Technology*, [online] 9(2), pp.237–243. Available at: <https://indianjournals.com/article/anft-9-2-014> [Accessed 9 July 2026].
- Ku-Vera, J.C., Castelán-Ortega, O.A., Galindo-Maldonado, F.A., Arango, J., Chirindo, N., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S.S., Flores-Santiago, E.J., Montoya-Flores, M.D. and Solorio Sánchez, F.J., 2020. Review: Strategies for enteric methane mitigation in cattle fed tropical forages. *Animal*, [online] 14, pp. s453–s463. <https://doi.org/10.1017/S1751731120001780>
- Mackie, R.I., Kim, H., Kim, N.K. and Cann, I., 2023. — Invited Review — Hydrogen production and hydrogen utilization in the

- rumen: key to mitigating enteric methane production. *Animal Bioscience*, [online] 37(2), pp.323–336. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0294>
- Martínez-Muñoz, D.S., Rivera-Cerón, F., Palacios-Solórzano, I., Ramírez-Martínez, B.A., Molina-Aguilar, C. and Moguel, B.B., 2022. Metagenómica y metatranscriptómica para mitigar las emisiones de metano por animales rumiantes. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, [online] 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.430>
- Menke, K.H. and Steingass, H., 1988. Estimation of the Energetic Feed Value Obtained from Chemical Analysis and in Vitro Gas Production Using Rumen Fluid. *Animal Research and Development*, 28, pp.7–55.
- Mitsumori, M. and Sun, W., 2008a. Control of Rumen Microbial Fermentation for Mitigating Methane Emissions from the Rumen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, [online] 21(1), pp.144–154. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.r01>
- Mitsumori, M. and Sun, W., 2008b. Control of Rumen Microbial Fermentation for Mitigating Methane Emissions from the Rumen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, [online] 21(1), pp.144–154. Available at: <https://www.animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2008.r01> [Accessed 10 July 2026].
- Mohamed Gomaa, R.M., González-Ronquillo, M., Arredondo-Ramos, J., Molina, L.T., Castelán-Ortega, O.A., Mohamed Gomaa, R.M., González-Ronquillo, M., Arredondo-Ramos, J., Molina, L.T. and Castelán-Ortega, O.A., 2017. Effect of tanniferous plants on in vitro digestion and methane production. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, [online] 4(11), pp.371–380. <https://doi.org/10.19136/era.a4n11.1160>
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. and Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, [online] 4(7), pp.1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- Nambiar, V. and Matela, H., 2012. Potential Functions of Lemon Grass *Cymbopogon citratus* in Health and Disease. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(5), pp.1035–1043.
- Olorunnisola, K.S., Asiyanbi-Hammed, T., Monsur, H.A. and Simsek, S., 2014. Biological properties of lemongrass: An overview. *International Food Research Journal*, 21(2), pp.455–462.
- Pal, K., Patra, A.K. and Sahoo, A., 2015. Evaluation of feeds from tropical origin for in vitro methane production potential and rumen fermentation in vitro. *Spanish Journal of Agricultural Research*, [online] 13(3), pp. e0608–e0608. <https://doi.org/10.5424/sjar/2015133-7467>
- Parnian-Khajezdizaj, F., Noel, S.J., Johansen, M., Weisbjerg, M.R., Hellwing, A.L.F., Højberg, O., Hall, M.B. and Lund, P., 2023. Methane emission, nutrient digestibility, and rumen microbiota in Holstein heifers fed 14 different grass or clover silages as the sole feed. *Journal of Dairy Science*, [online] 106(6), pp.4072–4091. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22638>
- Patra, A.K., 2017. Prediction of enteric methane emission from cattle using linear and non-linear statistical models in tropical production systems. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, [online] 22(4), pp.629–650. <https://doi.org/10.1007/s11027-015-9691-7>
- Petrič, D., Mravčáková, D., Kucková, K., Čobanová, K., Kišidayová, S., Cieslak, A., Ślusarczyk, S. and Váradyová, Z., 2020. Effect of dry medicinal plants (wormwood, chamomile, fumitory and mallow) on in vitro ruminal antioxidant capacity and fermentation patterns of sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, [online] 104(5), pp.1219–1232. <https://doi.org/10.1111/jpn.13349>
- Pineda, G.S.H., Beltrán, P.E.P., Benaouda, M., García, J.M.P., Nova, F.A., Molina, L. and Ortega, O.A.C., 2018a. *Pithecellobium dulce*, *Tagetes erecta* and *Cosmos*

- bipinnatus on reducing enteric methane emission by dairy cows. *Ciência Rural*, [online] 48, p.e20170484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170484>
- Pineda, G.S.H., Beltrán, P.E.P., Benaouda, M., García, J.M.P., Nova, F.A., Molina, L. and Ortega, O.A.C., 2018b. *Pithecellobium dulce*, *Tagetes erecta* and *Cosmos bipinnatus* on reducing enteric methane emission by dairy cows. *Ciência Rural*, [online] 48, p.e20170484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170484>
- Singh, R.K., Dey, A., Paul, S.S., Singh, M. and Punia, B.S., 2018. Responses of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oils Supplementation on in Vitro Rumen Fermentation Parameters in Buffalo. *Indian Journal of Animal Nutrition*, [online] 35(2), pp.174–179. Available at: <https://indianjournals.com/article/ijan-35-2-008> [Accessed 8 July 2026].
- Todd, R.W., Cole, N.A., Casey, K.D., Hagevoort, R. and Auvermann, B.W., 2011. Methane emissions from southern High Plains dairy wastewater lagoons in the summer. *Animal Feed Science and Technology*, [online] 166–167, pp.575–580. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.040>
- Ungerfeld, E.M., 2020. Metabolic Hydrogen Flows in Rumen Fermentation: Principles and Possibilities of Interventions. *Frontiers in Microbiology*, [online] 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991a. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), pp.3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991b. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), pp.3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vázquez-Carrillo, M.F., Montelongo-Pérez, H.D., González-Ronquillo, M., Castillo-Gallegos, E. and Castelán-Ortega, O.A., 2020a. Effects of Three Herbs on Methane Emissions from Beef Cattle. *Animals*, [online] 10(9), p.1671. <https://doi.org/10.3390/ani10091671>
- Vázquez-Carrillo, M.F., Montelongo-Pérez, H.D., González-Ronquillo, M., Castillo-Gallegos, E. and Castelán-Ortega, O.A., 2020b. Effects of Three Herbs on Methane Emissions from Beef Cattle. *Animals*, [online] 10(9), p.1671. <https://doi.org/10.3390/ani10091671>
- Vázquez-Carrillo, M.F., Zaragoza-Guerrero, R., Corona-Gochi, L., González-Ronquillo, M., Castillo-Gallegos, E. and Castelán-Ortega, O.A., 2023. Effect of *Cymbopogon citratus* on Enteric Methane Emission, Nutrients Digestibility, and Energy Partition in Growing Beef Cattle. *Agriculture*, [online] 13(4), p.745. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040745>
- Vogels, G.D., Hoppe, W.F. and Stumm, C.K., 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, [online] 40(3), pp.608–612. <https://doi.org/10.1128/aem.40.3.608-612.1980>
- Wanapat, M., Cherdthong, A., Pakdee, P. and Wanapat, S., 2008. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder supplementation. *Journal of Animal Science*, [online] 86(12), pp.3497–3503. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0885>