



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“EFECTO DE *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* SOBRE LA EMISIÓN DE METANO Y LA PRODUCCIÓN DE LECHE DEL GANADO BOVINO”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:  
**AEA. GLORIA STEFANNY HERNÁNDEZ PINEDA**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“EFECTO DE *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* SOBRE LA EMISIÓN DE METANO Y LA PRODUCCIÓN DE LECHE DEL GANADO BOVINO”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

**AEA. GLORIA STEFANNY HERNÁNDEZ PINEDA**

### COMITÉ TUTORAL

TUTOR ACADÉMICO: PhD. Octavio Alonso Castelán Ortega

TUTORES ADJUNTO: Dra. Francisca Áviles Nova

TUTORES ADJUNTO: Dr. José Manuel Palma García

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, 2017

## Resumen

**Antecedentes:** para mitigar el impacto ambiental generado por la explotación ganadera se han realizado diferentes estudios sobre el uso plantas herbáceas con contenido moderado de taninos para reducir la producción de metano en el rumen.

**Objetivo:** evaluar el efecto de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* sobre la emisión de metano y la producción de leche en el ganado bovino.

**Métodos:** se usó un diseño experimental de cuadrado latino 4 x 4. Se emplearon cuatro vacas raza Holstein, multíparas, con peso vivo aproximado de  $553 \pm 72.4$  kg, en segundo tercio de lactación, con una producción de leche de  $17.3 \pm 3$  La duración del experimento fue de 92 días, divididos en cuatro periodos experimentales de 23 días cada uno. Las vacas fueron alimentadas con ensilado de maíz-alfalfa en proporción 50:50 a libre acceso, 4 kg de concentrado/día y agua *ad libitum*. Los tratamientos consistieron en la suplementación de 0.5 kg/día de las plantas experimentales y un tratamiento control sin planta. Cada una de las vacas paso por cada tratamiento en los cuatro periodos. **Resultados:** *C. bipinnatus* mostró una disminución en la producción de metano del 16% ( $p < 0.05$ ) respecto a la dieta control. La producción y composición de leche y el consumo de materia seca no se vio afectado ( $p > 0.05$ ) por el uso de *C. bipinnatus* ni por las otras plantas. **Conclusiones:** la inclusión de plantas que contienen metabolitos secundarios en la dieta de los animales, como *C. bipinnatus*, a dosis bajas tienen potencial para mitigar la producción de metano.

**Palabras clave:** metano, ganadería, cambio climático, mitigación.

## Summary

**Background:** in order to mitigate the environmental impact of cattle different studies have been conducted to assess the effect of herbaceous plants, with moderate tannin content, on methane ruminal production. **Objective:** the aim of the present work is to evaluate the effect of *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* and *Cosmos bipinnatus* on methane emission, milk yield and dry matter intake in dairy cattle. **Methods:** a 4 × 4 Latin square experimental design was used, where four multiparous Holstein cows of 553±72.4 kg live weigh, at their second lactation third and average milk yield of 17.3±3 kg/day were used. The experiment lasted 92 days divided into four experimental periods of 23 days each. All cows had free access to maize and alfalfa-silage in a proportion 50:50, 4 kg of concentrate/day and *ad libitum* access to water. The treatments consisted in supplementation of 0.5 kg/day of the experimental plants, the cows in the control treatment did not receive any plant. Each cow received each treatment, one in each of four periods. **Results:** *C. bipinnatus* reduced significantly methane production in 16% ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control diet. Milk production, milk composition and dry mater intake were not affected ( $p > 0.05$ ) by the use of *C. bipinnatus* or the other plant species. **Conclusions:** the supplementation at low doses of *C. bipinnatus*, a shrub plant with moderate tannin content, showed potential to reduce ruminal methane production in dairy cows.

**Keywords:** methane, cattle, climate change, mitigation.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN DE ITERATURA .....	3
2.1 El papel de los gases efecto invernadero sobre el cambio climático. ....	3
2.2 Principales gases efecto invernadero .....	4
2.3 La agricultura en la emisión de gases de efecto invernadero .....	5
2.4 El papel del ganado en la emisión de gases de efecto invernadero. ....	6
2.5 Estrategias para reducir las emisiones de metano en la ganadería.....	8
2.6 El uso de metabolitos secundarios para reducir la producción entérica de metano .....	10
2.6.1 Saponinas.....	11
2.6.2 Taninos .....	12
2.7 Métodos para la medir la producción de metano en el ganado bovino. ....	13
2.8 Gases trazadores.....	14
2.9 Métodos in vitro.....	15
2.10 Cámaras de respiración. ....	16
2.11 Caja de cabeza .....	16
3. JUSTIFICACIÓN .....	18
4. HIPÓTESIS .....	19
5. OBJETIVOS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1 Área de estudio:.....	21
6.2 Diseño experimental: .....	21
6.3 Selección de plantas. ....	22
6.4 Medición de la producción de CH <sub>4</sub> in vivo: .....	23
6.5 Análisis químicos de muestras de alimentos: .....	24
6.6 Heces.....	24
6.7 Análisis de resultados: .....	25
7. RESULTADOS .....	26

8. DISCUSION GENERAL .....	45
9. CONCLUSIÓN .....	48
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIAS.....	49

## **Contenido de figuras**

**Figura 1:** Flujo de carbono a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el rumen ..... 7

**Figura 2:** Lay Out del sistema de medición de CH<sub>4</sub> ..... 24

## **Contenido de Imágenes**

<b>Imagen 1:</b> caja de cabeza del Laboratorio de Ganadería, Medio Ambiente y Energías Renovables de la Universidad Autónoma del Estado de México .....	17
--	----



## 1. INTRODUCCIÓN

Los gases que contribuyen al efecto invernadero son principalmente el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el metano (CH<sub>4</sub>) y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). El primero es considerado como el más abundante y el que en la actualidad tiene un mayor aporte en el incremento del calentamiento global. Solomon *et al.* (2007), señalaron que las concentraciones de CH<sub>4</sub> son inferiores a las de CO<sub>2</sub>, sin embargo el primero está incrementando significativamente, causando a su vez 34 veces mayor efecto invernadero y por ende calentamiento global. El N<sub>2</sub>O está presente en la atmósfera en cantidades muy reducidas, su capacidad de retención de calor es 296 veces superior a la del CO<sub>2</sub> y su tiempo de permanencia en la atmósfera es de 114 años aproximadamente (Carmona *et al.*, 2005).

El gas metano es uno de los agentes causantes del deterioro en la capa de ozono, la cual ha tenido daños severos después de la revolución industrial, donde el consumo per cápita de diferentes alimentos aumento considerablemente, con este hecho la producción de gas metano también incremento (IPCC, 2014). El aumento en la producción de ganado, el uso y la extracción de combustibles fósiles y la producción de arroz son las principales fuentes de CH<sub>4</sub> antropogénico. La agricultura aporta alrededor del 13% de la emisión total de gases de efecto invernadero (GEI) (IPCC, 2014), de este la ganadería es responsable del 53% de CH<sub>4</sub> emitido (Charmley *et al.*, 2016).

Para mitigar el impacto ambiental generado por las explotaciones ganaderas se han realizado diferentes estudios sobre la alimentación para el ganado bovino y el uso de diversos compuestos naturales con el objeto de que disminuya la producción de CH<sub>4</sub> (Cuartas *et al.*, 2013). Dijkstra *et al.* (2011) utilizaron una dieta con alto contenido de almidón para optimizar la fermentación del alimento consumido y así reducir el pH en el rumen y la actividad metanogénica. Autores como Naumann *et al.* (2013) utilizaron dos ecotipos de *Acacia angustissima* (South Texas ecotype y Cross timbers ecotype) con contenidos de taninos condensados de 8.4 y 8.9% respectivamente, en pruebas *in vitro*, encontrando reducciones en la emisión de CH<sub>4</sub> entre un 3.2 y 0.5% respectivamente. Del mismo modo Abreu *et al.* (2003) realizaron pruebas *in vitro* con el fruto de

*Sapindus saponaria* con un contenido de 9.6% de saponina observando una reducción de 9.5%. Los taninos están presentes en las leguminosas tropicales, las cuales son utilizadas como suplemento alimenticio por ser una fuente de proteína importante, de buena calidad, ya que contienen una alta cantidad de aminoácidos esenciales, lo cual las hacen mejores que las gramíneas tropicales, puesto que presentan menor contenido de pared celular con mayor contenido de lignina que las gramíneas. Se tiene claramente establecido que en estados de crecimiento comparables, las leguminosas presentan mayor digestibilidad, consumo, contenido de proteína (5% más) y calcio comparadas con las gramíneas (Johannes *et al.*, 2011), por tanto las investigaciones sobre plantas con contenidos de taninos ha tomado una mayor importancia. Por ejemplo, Bhatta *et al.* (2009) evaluaron diferentes tipos de taninos naturales sobre la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro*, utilizando diferentes concentraciones de estos encontraron una disminución de 0.6% con taninos hidrolizables y 5.5% con una asociación de taninos condensados más taninos hidrolizables. Asimismo, se han realizado estudios *in vitro* con *Tajetes erecta* incluida en una dieta base de pasto estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) y concentrado compuesto por 24% de maíz, 10.8% de soya, 4% de melaza y 1.2% de urea, a diferentes niveles de taninos condensados (bajo, medio y alto), demostrando que la producción *in vitro* de CH<sub>4</sub> se redujo hasta en un 39% (Andrade *et al.*, 2012)

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* sobre la emisión de CH<sub>4</sub> y la producción de leche en el ganado bovino.

## **2. REVISIÓN DE ITERATURA**

### **2.1 El papel de los gases efecto invernadero sobre el cambio climático.**

El cambio climático a nivel mundial representa la mayor preocupación de diferentes organizaciones como la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), entre otras, que trabajan en aras de mejorar la calidad del ambiente (Steinfeld *et al.*, 2009).

El efecto invernadero es causado por la presencia creciente en el aire de una serie de gases que capturan el calor e impiden su salida al espacio exterior. El calor atrapado es transmitido por estos gases al resto de la atmósfera provocando un incremento en la temperatura. Cuanto mayor sea la presencia de gases efecto invernadero (GEI) en la atmósfera, mayor será su capacidad para retener energía y generar más calentamiento en el planeta (Santillán *et al.*, 2013).

Se ha evidenciado que las actividades humanas como los procesos industriales, la agricultura, la silvicultura y la producción de arroz emiten GEI, lo cual ocasiona su continuo deterioro. La cantidad de GEI liberados por medio de la actividad humana se ha elevado significativamente en los últimos años, provocando el aumento del efecto invernadero natural y el cambio climático global (Bonilla y Lemus, 2012). Algunas proyecciones indican que la temperatura media global podría aumentar entre 1,4 °C y 5,8 °C para el año 2100 (CMNUCC, 2005).

El protocolo de Kyoto (1998), indica que entre los GEI más potentes se encuentran el CO<sub>2</sub>, el N<sub>2</sub>O, los hidrofluorocarbonos (HFC), los perfluorocarbonos, (PFC), el hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) y el CH<sub>4</sub>. El aumento de la concentración mundial de CO<sub>2</sub> se debe principalmente a la utilización de combustibles de origen fósil y a los cambios de uso de la tierra. El aumento de CH<sub>4</sub> ha sido menor después de los años noventa en relación con las emisiones totales que han sido relativamente constantes durante ese período (IPCC, 2014).

## 2.2 Principales gases efecto invernadero

El CO<sub>2</sub> es el gas que más aporta al calentamiento global puesto que sus emisiones y concentraciones son más altas que las de otros gases (Montzka *et al.*, 2011). Las cantidades de carbono que provienen del planeta, a través de la fotosíntesis y la respiración son enviadas a la atmósfera, estas grandes cantidades (alrededor de 50 miles de millones de toneladas/año) producen oscilaciones en las concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico. Estos flujos biológicos de carbono en un año son diez veces más altos que la cantidad de carbono liberada en la atmósfera por la quema de combustibles fósiles (4 – 5 miles de millones de toneladas/año) (Steinfeld *et al.*, 2009). Así, las adiciones netas de carbono a la atmósfera se estiman entre 4500 y 6500 millones de toneladas al año (Steinfeld *et al.*, 2009).

El sector agrícola también afecta el balance de carbono, produciendo el 9% de las emisiones de CO<sub>2</sub>, principalmente por las tierras destinadas a la producción de cultivos forrajeros que cubren dos terceras partes del total de la superficie agrícola (IPCC, 2014). Cerca del 70% de las tierras de pastoreo en las zonas áridas están degradadas, principalmente a causa del exceso de pastoreo, la compactación de la tierra y la erosión causadas por el ganado, contribuyendo indirectamente a la liberación de grandes cantidades de carbono a la atmósfera (Blas *et al.*, 2008).

El CH<sub>4</sub> es el segundo gas efecto invernadero más importante. Después de ser emitido permanece en la atmósfera aproximadamente de 9 a 15 años. De esta manera las concentraciones atmosféricas de CH<sub>4</sub> se han incrementado aproximadamente un 150 % desde la era preindustrial (Steinfeld *et al.*, 2009).

Las emisiones de este gas proceden de una variedad de fuentes, como los rellenos sanitarios, los sistemas de petróleo y gas natural, las actividades agrícolas, la minería del carbón, la combustión de fuentes móviles y fijas, el tratamiento de aguas residuales y ciertos procesos industriales (EPA, 2010). Se calcula en 320 millones de toneladas CH<sub>4</sub>/año la cantidad global de CH<sub>4</sub> antropogénico, esto es, 240 millones equivalentes de CO<sub>2</sub>/año (Aardenne *et al.*, 2001).

La ganadería también es responsable del 53% de CH<sub>4</sub> antropogénico, del total del sector agrícola, el cual en su mayor parte es proveniente del proceso fermentativo que ocurre en la digestión entérica de los rumiantes (Charmley *et al.*, 2016).

El  $N_2O$  es el tercer GEI con mayor potencial para el calentamiento global. No obstante está presente en la atmósfera en cantidades muy reducidas, su capacidad de retención de calor es 296 veces superior a la del  $CO_2$  y su tiempo de permanencia en la atmósfera es de 114 años aproximadamente (Aardenne *et al.*, 2001).

Este gas es considerado de larga vida, es químicamente estable y persistente en la atmósfera desde décadas hasta siglos o más, de modo que su emisión ejerce influencia en el clima a largo plazo. Debido a su larga vida, el  $N_2O$  se mezcla bien en la atmósfera, mucho más rápido de lo que puede ser eliminado, los datos de su concentración mundial se puede calcular con exactitud en pocas localidades pues su cantidad en el aire es leve y poco perceptible (Solomon *et al.*, 2007).

### **2.3 La agricultura en la emisión de gases de efecto invernadero**

La producción pecuaria y la agricultura aportan grandes emisiones de gases a la atmósfera, principalmente  $CH_4$ ,  $CO_2$ , y  $N_2O$ , causando calentamiento de la superficie terrestre y la destrucción de la capa de ozono en la estratósfera (Montenegro, 2000). Un incremento en el rendimiento tanto de la producción pecuaria como de los cultivos forrajeros, mediante el mejoramiento genético, la manipulación de las dietas y el uso eficiente de praderas puede reducir las emisiones de GEI provenientes de la deforestación y la degradación de los pastizales, puesto que un control adecuado de todos estos parámetros pueden mejorar el rendimiento de la producción agropecuaria y la calidad del aire (Knapp *et al.*, 2014).

Las emisiones directas del ganado derivan de los procesos respiratorios en forma de  $CO_2$ . Asimismo, los rumiantes, y en menor medida los monogástricos emiten  $CH_4$  como parte del proceso digestivo donde ocurre la fermentación microbiana de los alimentos fibrosos. El estiércol animal también es fuente de emisiones de  $CH_4$ ,  $CO_2$  y  $N_2O$ , dependiendo el grado de emisión de la modalidad de producción y de su manejo (Cassandro *et al.*, 2013).

## **2.4 El papel del ganado en la emisión de gases de efecto invernadero.**

Los rumiantes poseen un sistema digestivo que les permite aprovechar materias primas que otras especies no pueden consumir, ya que tienen la capacidad de convertir el material fibroso en alimentos de alta calidad nutritiva como la carne y/o leche. Anatómicamente este sistema, presenta cuatro compartimentos gástricos: rumen, retículo, omaso y abomaso, éstos forman un solo estómago que ocupa casi tres cuartas partes de la cavidad abdominal; las tres primeras divisiones son consideradas como proventrículos o bolsas esofágicas, están revestidos por una membrana mucosa cubierta de epitelio escamoso desprovisto de glándulas. El abomaso o estómago verdadero posee una membrana mucosa glandular (Blas *et al.*, 2008). Por su parte, el intestino delgado posee tres características que lo hacen importante en el sistema digestivo, sus pliegues mucosos que mezclan la ingesta, la villi y la microvilli ayudan a la digestión química. El intestino grueso absorbe ácidos grasos volátiles (AGV), los movimientos peristálticos y antiperistálticos del ciego y el colon proximal proyectan y mezclan la ingesta hacia el colon distal (Shimada, 2009).

El alimento que el animal ingiere entran al rumen y allí se fermentan parcialmente, produciendo piruvato, AGV, CH<sub>4</sub>, células microbianas y CO<sub>2</sub>. Los AGV son absorbidos en su mayoría a través de la pared ruminal y los gases son expulsados mediante el eructo (Blas *et al.*, 2008), como se presenta en la figura 1, la cual describe el flujo de carbono en el rumen.

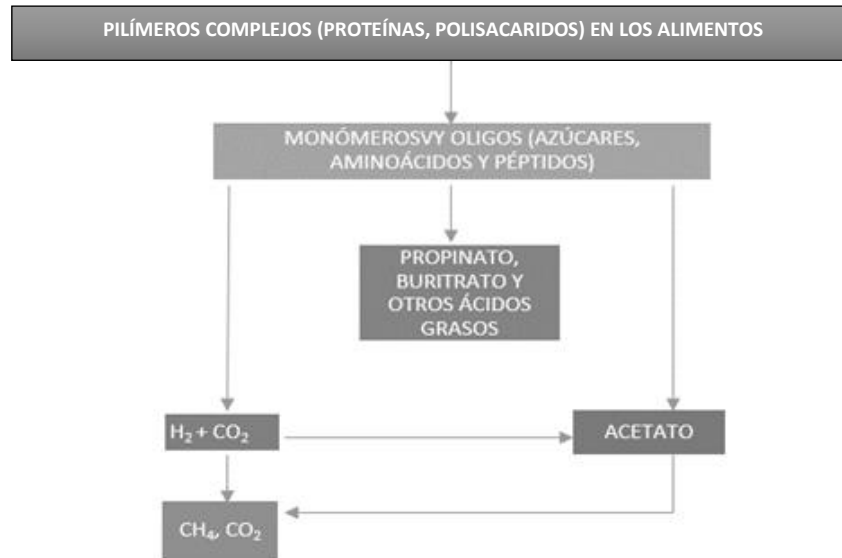


Figura 1: Flujo de carbono a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el rumen. Tomado de: Sosa *et al.* (2007).

La producción de CH<sub>4</sub> en la naturaleza se da principalmente por dos vías:

1.  $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
2.  $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$

En el rumen se produce por la segunda vía. Se estima que en los sistemas de producción tecnificados, la producción anual de CH<sub>4</sub> se encuentra entre 60 y 126 kg/vaca lechera. La liberación de CH<sub>4</sub> vía eructo en el ganado empieza aproximadamente a las cuatro semanas de vida, cuando el alimento sólido comienza a ser retenido en el retículo-rumen, incrementándose la fermentación de gases a medida que este se va desarrollando (Carmona *et al.*, 2005).

El CH<sub>4</sub> es producido en el rumen como resultado de la actividad de un grupo de bacterias metanogénicas (*Archaea*), que forman parte, junto con bacterias protozoos y hongos de un diverso ecosistema microbiano hallado en el rumen, estas adquieren energía mediante la producción del CH<sub>4</sub> al descomponer la fibra que el animal ingiere. La generación de este gas no es realmente el objetivo de las arqueas, en realidad la función de este proceso metabólico es la obtención de energía en forma de Adenosín Trifosfato (ATP), o de moléculas destinadas para la biosíntesis. Esta reacción se logra a partir de CO<sub>2</sub> y de hidrógeno (H<sub>2</sub>), donde el CO<sub>2</sub> es un aceptor de electrones que es reducido gracias a los electrones

suministrados por H<sub>2</sub> (Shimada, 2009). Dadas sus características, estos organismos tienen una gran importancia, puesto que intervienen en la degradación de la materia orgánica en la naturaleza y en el ciclo del carbono. En los diferentes hábitats anaerobios, se han identificado cerca de 70 especies de microorganismos metanogénicos pertenecientes a 21 géneros, sin embargo solo *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium mobile*, *Methanorevibacter ruminantium*, *Methanorevibacter smithii*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi* han sido aisladas del rumen. (Sosa *et al.*, 2007).

## **2.5 Estrategias para reducir las emisiones de metano en la ganadería.**

La manipulación de la dieta del ganado bovino se considera una posible alternativa para mitigar la producción de CH<sub>4</sub> y a su vez disminuir las pérdidas energéticas del animal en este proceso, puesto que entre mejor calidad tenga el alimento menos tiempo permanecerá en el rumen, así el proceso digestivo no gastará mayores cantidades de energía y la producción de CH<sub>4</sub> será menor (Aluwong *et al.*, 2011).

Existen evidencias (Blummel *et al.*, 2005; Cassandro *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014) que plantean que la tasa de emisión de CH<sub>4</sub>, por fermentación entérica está relacionada con el alimento consumido. Igualmente se muestra que entre los factores que influyen en su producción están las características químicas y físicas del alimento como la cantidad de materia seca (MS), que en grandes dosis produce más fermentación, la proteína, los carbohidratos, la cantidad de materia orgánica (MO), la celulosa, la hemicelulosa, la cantidad de heces vasculares, que a mayor cantidad mayor contenido de lignina, entre otros que perjudican el nivel de consumo y la constancia de alimentación. Por tanto una subnutrición contribuye a incrementar los niveles de emisión de CH<sub>4</sub> ya que el alimento de mala calidad contiene mayor cantidad de fibra, por ende permanecerá más tiempo en el rumen y la producción de gases será más alta (Carmona *et al.*, 2005).

La defaunación en el rumen se ha considerado como una alternativa para reducir la metanogénesis, puesto que se han descrito interacciones específicas de los



protozoos ciliados con bacterias metanogénicas endo y ectosimbióticas (Leng, 2014). No obstante, considerando las dificultades que implica la defaunación total, se ha propuesto la reducción en vez de la eliminación total de ciliados del rumen como una opción para mejorar la productividad con dietas tropicales y reducir la emisión de CH<sub>4</sub> (Abreu *et al.*, 2003).

Grainger *et al.* (2010) evaluaron los efectos sobre la producción de CH<sub>4</sub> implementando en dietas de vacas lecheras semilla de algodón a una tasa de 2,6 kg MS / vaca / día durante 12 semanas. Estos autores, observaron una reducción de 5,1 % (g / kg de MS), en la primera semana, y un incremento de 14,5 % en la semana 12.

Las emisiones de CH<sub>4</sub> (g de CH<sub>4</sub> /kg de materia seca ingerida) están influenciadas por el tipo de forraje. Animales que consumen leguminosas generalmente emiten menos CH<sub>4</sub> en comparación con otras pasturas consumidas como heno. McCaughey *et al.* (1999) observaron en ganado de carne una reducción del 10% en la producción de CH<sub>4</sub> cuando la dieta fue de 100% heno y se sustituyó por alfalfa: heno (70: 30). Así mismo, Benchaar *et al.* (2001), mostraron que la sustitución de heno de *Phleum pratense* por alfalfa reduce la emisión de CH<sub>4</sub> en un 21% (expresado en % de energía digestible).

También ha sido estudiado (Wina *et al.*, 2005; Guimaraes *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2011) el uso de metabolitos secundarios de algunas plantas como estrategia de mitigación de CH<sub>4</sub>. Las plantas contienen metabolitos secundarios que las protegen de los ataques de hongos, bacterias, insectos y herbívoros. El efecto de estos compuestos sobre la metanogénesis ruminal es altamente variable. La mayoría de trabajos se refieren a la utilización de taninos, saponinas y aceites esenciales. Cuando altos niveles de estas sustancias son ingeridas pueden ocasionar efectos adversos sobre el rendimiento y la salud de los animales, pero en concentraciones moderadas, son capaces de mejorar el proceso de fermentación en el rumen (Williams *et al.*, 2011).

Los taninos pueden llegar a reducir el consumo de plantas a causa de una disminución en la gustosidad o por afectar negativamente la digestión del animal. También producen una sensación de astringencia, causada por la formación de

complejos entre taninos y glucoproteínas salivales, esto puede incrementar la salivación y disminuir la gustosidad. Se conoce que los taninos hidrolizables son compuestos tóxicos para los rumiantes. Las lesiones principales asociadas con dicha toxicidad son gastroenteritis hemorrágica, necrosis hepática y daño renal con necrosis tubular proximal (Patra y Saxena., 2010).

Los taninos pueden estar asociados con menor consumo de materia seca y la reducción de la digestión de proteínas y fibra. Estos efectos dependen de la concentración de taninos en la planta y también de otros factores, tales como tipo de tanino, especies animales, el estado fisiológico de la planta y la composición de la dieta (Makkar, 2003). Sin embargo, la presencia de niveles moderados de taninos, en particular los condensados en el rumen se relaciona con la protección de la proteína frente a la degradación por microorganismos ruminales, aumentando el flujo de la proteína dietética para ser absorbida en los intestinos (Guimaraes *et al.*, 2006).

## **2.6 El uso de metabolitos secundarios para reducir la producción entérica de metano**

El término “metabolito secundario” se utiliza para describir una amplia gama de compuestos químicos que contienen las plantas, estos son sintetizados por las mismas y cumplen funciones no esenciales en ellas. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones entre la planta y su hábitat (Patra y Saxena., 2010).

El estudio de los metabolitos secundarios se inició aproximadamente hace 200 años (Hartmann 2007). La investigación sobre estos se inicia a partir de que se les empieza a ver cierto potencial en el uso médico y en la preservación de alimentos. Las concentraciones de los diferentes metabolitos secundarios que puedan tener las plantas dependerán de la variedad, familia y especie de la misma, condiciones climáticas, tiempo de recolección, entre otros parámetros.

Aproximadamente 200.000 estructuras de metabolitos secundarios se han identificado (Hartmann 2007), algunos de estos han mostrado un gran potencial en

cuanto a la reducción de la producción de CH<sub>4</sub> generado por los rumiantes, por tanto los estudios con diferentes metabolitos secundarios se han vuelto de vital importancia para el sector agropecuario. A continuación se describen los que se han empleado en la reducción de la emisión de CH<sub>4</sub>.

### 2.6.1 Saponinas

Existen una gran variedad de plantas que poseen saponinas en diferentes concentraciones. Las saponinas son metabolitos secundarios tóxicos, su nivel de toxicidad probablemente proviene de la capacidad que tienen de formar complejos con esteroides, por lo que pueden interferir en la asimilación de estos (Kumar *et al.*, 2014). Sin embargo, para lograr un efecto tóxico en un animal, se requiere suministrar una alta cantidad de saponinas, lo cual no es necesario también para lograr un efecto positivo en la disminución de la emisión de CH<sub>4</sub>.

El efecto de las saponinas en las bacterias metanogénicas ruminales es diverso. Guo *et al.* (2008), encontraron que las saponinas de té, en pruebas *in vitro* (0,4 mg/ml) no tuvo efecto sobre el crecimiento, en particular del cultivo de metanógenas *Methanobrevibacter ruminantium*. Por otro lado, Goel *et al.* (2008), reportaron una reducción de 21% en la población de metanógenas al utilizar en pruebas *in vitro* saponinas de *Knautia*, por lo que se puede decir que el uso de saponinas para lograr una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> es relativa y dependerá del animal, la especie de la planta con contenidos de saponinas y las diversas condiciones ruminales.

En cuanto a las investigaciones realizadas *in vivo* encontramos que por ejemplo al utilizar extracto de *Manihot esculenta*, con un contenido de 8-10% de saponinas, suministrado a ovejas, en la dieta a dosis de 13,8 g/kg de consumo no mostró una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> (Pen *et al.* 2007). Asimismo al utilizar *Y. schidigera* que contiene 6% de saponinas, suministrado en vacas lecheras durante 28 días no tuvo repercusión en la producción de CH<sub>4</sub>, esto posiblemente debido a la adaptación de la microflora ruminal a las saponinas (Holtshausen *et al.*, 2009). Algunos estudios han indicado que la producción de CH<sub>4</sub> puede ser afectada por las saponinas al limitar la velocidad de la metanogénesis como tal, a través de la

disminución de la actividad de algunos cultivos de bacterias metanogénicas (Guo *et al.*, 2008). Por otra parte las saponinas pueden influir sobre la metanogénesis de forma indirecta por medio de la inhibición de protozoos (Goel *et al.*, 2008).

### **2.6.2 Taninos**

Los taninos son sustancias polifenólicas con diferentes pesos moleculares y complejidad, siendo clasificadas en hidrolizables (TH) y condensados (TC). Los taninos tienen capacidad de formar complejos, principalmente con las proteínas. Estos se producen en muchos árboles, arbustos, frutas, cereales, legumbres y granos. La actividad antimetanogénica de los taninos se ha atribuido principalmente al grupo de los TC (Piluzza *et al.*, 2013).

La disminución en la degradabilidad de la proteína en el rumen es provocada por la formación de complejos uniones tanino-proteína, que previene que la proteína sea atacada por los microbios ruminales. Este proceso es benéfico para el animal puesto que aprovecha mejor la proteína ingerida a nivel intestinal. (Mueller-Harvey, 2006). Los taninos también pueden reducir la metanogénesis al disminuir el número de protozoarios y de bacterias metanogénicas. (Patra y Saxena., 2010). La acción de los TC en la metanogénesis puede deberse a la inhibición directa sobre las bacterias metanogénicas, dependiendo de su especie y de la estructura química del TC ofertado al animal (Makkar 2003). La acción de los taninos sobre la inhibición del crecimiento de las bacterias metanógenas dependerá del tipo de tanino y de las dosis suministradas. Asimismo, se observa que los resultados obtenidos en la disminución de la producción de CH<sub>4</sub> dependerá de la planta, de su especie y de su familia (Piluzza *et al.*, 2013). La toxicidad de los taninos sobre los protozoos del rumen es menor frente a los efectos tóxicos de las saponinas. (Bodas *et al.*, 2012)

Los efectos de los taninos del quebracho adicionado en un nivel de 10 a 20g/kg MS al líquido ruminal de vacas en pastoreo alimentadas con trigo, por 63 días redujo la emisión de CH<sub>4</sub> de 25 a 51%, sin embargo no se mostró ningún efecto de los taninos en las bacterias metanogénicas (Min *et al.*, 2006). Del mismo modo Beauchemin *et al.* (2007) no encontraron ningún efecto sobre la metanogénesis

cuando se le oferto a ganado de carne de 10 a 20 g/kg MS de tanino de quebracho por 28 días.

Al incluir taninos en la dieta animal se podría observar una disminución en la digestibilidad de la fibra, lo que podría causar la reducción en la producción de CH<sub>4</sub>. Los taninos realizan acciones anti-microbianas en el rumen (Patra, y Saxena, 2009), que muestran diferentes efectos sobre la fermentación ruminal y la digestión de los alimentos, sin embargo los microbios del rumen pueden desarrollar mecanismos de adaptación para hacerse resistentes a los efectos de los taninos a través de la desintoxicación de taninos y la síntesis de polímeros formadores de complejos (Smith *et al.*, 2005).

Las concentraciones de taninos superiores al 5% en las dietas ofertadas podrían afectar de forma negativa el consumo voluntario del animal. Diversos estudio. (Bhatta et al, 2009 Grainger et al, 2009) han demostrado, en pruebas *in vitro* e *in vivo* que los taninos reducen la digestibilidad de los alimentos, por ello una concentración de taninos superior al 5% en la dieta no solo puede afectar el consumo voluntario sino también la utilización de nutrientes del alimento y por tanto la productividad animal, por lo cual es de suma importancia considerar el estudio de dosis apropiadas de taninos a suministrar en una dieta para lograr la reducción de la producción de CH<sub>4</sub> sin tener una afección en el metabolismo ruminal. Estos efectos claramente dependerán del tipo de tanino y la concentración de estos en la planta utilizada (Waghorn, 2008),

## **2.7 Métodos para la medir la producción de metano en el ganado bovino.**

Desde hace aproximadamente 100 años han surgido diferentes métodos desarrollados para medir y estimar las emisiones de CH<sub>4</sub> de los rumiantes. Estos métodos tienen diferentes modos de aplicación, tienen ventajas y desventajas, ninguno es perfecto puesto que algunos son caros otros más económicos, otros se adaptan a los animales en pastoreo, entre otras cosas. Todos estos factores afectan los resultados de las emisiones y su interpretación, de allí la importancia de conocer todas las posibilidades y limitantes de cada método (Storm *et al.*, 2012)

Dos métodos principales se han empleado para medir las emisiones de CH<sub>4</sub>: las cámaras de respiración y el hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) como gas trazador. El primer método generalmente se utiliza en laboratorios adecuados para realizar esta medición con animales estabulados, el segundo se utiliza para animales en pastoreo. El método de gas trazador es el más apropiado, puesto que es más cómodo para el animal, la medición se puede hacer mientras el animal se encuentra en pastoreo, sin embargo el método de las cámaras de respiración es utilizado con mayor frecuencia debido a que sus datos son altamente confiables (Pinares *et al.*, 2011).

La medición directa de emisiones de CH<sub>4</sub> por animal utilizando alguna de estas dos técnicas requiere una inversión considerable en infraestructura, equipos y apoyo técnico, para asegurar el bienestar del animal y el buen desarrollo de los proyectos que se lleven a cabo para la medición de las emisiones de CH<sub>4</sub> producidas por el ganado (Tomkins *et al.*, 2011).

## **2.8 Gases trazadores**

Este método es relativamente nuevo, fue descrito por primera vez en 1993 y 1994 por Johnson *et al.* (1994). El principal propósito de este método consiste en evaluar la eficacia energética de animales en sistemas de pastoreo. Anteriormente, se consideraba poco factible traspasar el sistema de medición de las cámaras de respiración hacia los animales en campo. Desde hace más de dos décadas es utilizado ampliamente en Canadá, Australia y Estados Unidos, también en países del norte de Europa. La idea detrás de este método es que la emisión de CH<sub>4</sub> puede ser medida si se conoce la emisión de otro gas desde el rumen, para este propósito se necesita de un gas estable, no tóxico e inerte físicamente (Johnson *et al.*, 1992). Este gas debe ser mezclado con el aire del rumen del mismo modo que el CH<sub>4</sub>. Es por ello que para esta técnica se escoge el Hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) puesto que es un gas estable, económico y tiene un alto índice de detección, puesto que es cinco veces más pesado que el aire (Storm *et al.*, 2012)

El SF<sub>6</sub> se llena en pequeños tubos impermeables y se calcula la tasa de difusión de este colocándolo en agua a 39 °C y se mide cuanto peso pierde el tubo, hasta que esté estable, posteriormente este tubo es ubicado en el rumen de un animal experimental. Seguidamente se inicia la recolección de aire con un aparato que consiste en una cánula de recolección, un tubo de cabestro y entubación capilar, la cual es ubicada en la nariz del animal y conectada con la cánula de recolección, esta entubación regula la tasa de recolección. El tiempo de recolección por lo general tiene una duración de 1 día. La concentración de CH<sub>4</sub> y SF<sub>6</sub> en la cánula se determina por cromatografía de gases. Este método da más variación en los resultados sobre la emisión de CH<sub>4</sub> que los resultados obtenidos con cámaras de respiración, sin embargo es el único método existente hasta el momento para realizar mediciones de CH<sub>4</sub> con animales en pastoreo (Pinares *et al.*, 2011).

## **2.9 Métodos in vitro.**

Estas técnicas ha sido usadas para simular la fermentación ruminal del alimento (Rymer *et al.*, 2005). Con el interés sobre el incremento de los gases invernadero aportados por la agricultura los métodos *in vitro* han sido modificados para evaluar la medición de la producción de CH<sub>4</sub> (Pellikaan *et al.*, 2011).

La base del sistema *in vitro* es fermentar el alimento bajo condiciones controladas de laboratorio utilizando microbios naturales del rumen, por ejemplo los alimentos que se usan para tratamientos diferentes son encubados a 39 °C con mezcla de fluido de rumen, buffer y minerales, por un cierto periodo de tiempo, normalmente 24, 48, 72, 96 o 144 horas (Storm *et al.*, 2012). La cantidad de gas total producida es medida y su composición es analizada generalmente por cromatografía de gases, para obtener los datos sobre la producción *in vitro* de CH<sub>4</sub>. Del mismo modo, es posible obtener la degradación *in vitro* de la muestra de alimento determinando así, sí la reducción de la producción de CH<sub>4</sub> está relacionada con la degradación total del alimento (Rymer *et al.*, 2005).

Existen varios sistemas *in vitro* empleados para la determinación de la producción de CH<sub>4</sub> por ejemplo con jeringas, rusitec, recipientes especiales para fermentación y sistemas automatizados (Pellikaan *et al.*, 2011). Dependiendo de las condiciones del laboratorio se pueden hacer diferentes incubaciones paralelas que permitirían

múltiples repeticiones en los experimentos que podrían sustentar estadísticamente las diferencias significativas en los diferentes tratamientos de alimentación.

Los resultados de estudios que reportan la producción de CH<sub>4</sub> tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que existen similitudes en el uso de ambos procedimientos experimentales (Patra y Saxena., 2010). Una clara desventaja de este método es que solo simula la fermentación ruminal de la alimentación pero no las emisiones ni la digestibilidad del animal completo (Storm *et al.*, 2012).

### **2.10 Cámaras de respiración.**

Hay un renovado interés en la medición del metabolismo energético basado en respirometría de circuito abierto como consecuencia indirecta de la preocupación de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero por el ganado. La respirometría de circuito abierto es un método de calorimetría indirecta que consiste en medir el intercambio de gases asociado con la oxidación de sustratos de energía y la determinación de la producción de calor asociado (Fernández *et al.*, 2012).

Tomkins *et al.* (2011) reportan que los valores de las emisiones de CH<sub>4</sub> con el método de cámaras de circuito abierto fue de 29,7 ± 3,70 g de CH<sub>4</sub>/Kg de MS en ovinos Emisiones calculadas utilizando algoritmos alternativos existentes oscilaron desde 82,7 hasta 112,7 g de CH<sub>4</sub>/d. Aproximadamente, 5,5 al 6,5 % de la ingesta de energía bruta se convierte en CH<sub>4</sub>, sin embargo, las mediciones realizadas en las cámaras de calorimetría indirecta han mostrado una amplia variación en la emisión de CH<sub>4</sub> debido a la alimentación, los requerimientos energéticos, el nivel de consumo, el estado fisiológico y la raza del animal, puesto que a pesar de que los animales experimentales se seleccionen en condiciones similares pueden existir variables respecto a las condiciones mencionadas anteriormente (Johnson *et al.*, 1995).

### **2.11 Caja de cabeza**

La Head Box es una cámara de respiración que funciona con el principio de calorimetría indirecta. Comúnmente esta cámara consta de una jaula de cabeza, diseñada para ser hermética, excepto por la parte donde se anexa la capucha



para que los animales ingresen su cabeza, una unidad de muestreo y análisis de gases, una capucha ajustable para permitir el ingreso de animales de diferentes tamaños y una unidad de procesamiento de datos, tal como se muestra en la imagen 1 (Pedraza *et al.*, 2016).

Suzuki *et al.* (2008) realizaron la construcción de una cámara de este tipo para llevar a cabo un experimento y así estimar el balance de energía de ganado Brahman con un peso corporal de  $372.8 \pm 34.4$ , alimentado con pasto Pangola. Las tasas de recuperación de  $\text{CO}_2$  estuvieron entre 96,5 % y 101,8 %. El volumen medio de la producción de  $\text{CH}_4$  era de 228,3 L/día y la pérdida de energía en forma de  $\text{CH}_4$  fue de 0.097 respecto a la ingesta de energía bruta.



Imagen 1: caja de cabeza del Laboratorio de Ganadería, Medio Ambiente y Energías Renovables de la Universidad Autónoma del Estado de México.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Por largo tiempo se han realizado diferentes investigaciones para determinar qué plantas con contenidos importantes de metabolitos secundarios pueden ayudar a disminuir la producción de CH<sub>4</sub> emitido por los rumiantes, sin embargo dichos estudios han variado tanto en su resultado en la reducción en CH<sub>4</sub> como en la inclusión de dichas plantas, y del uso de estos metabolitos secundarios, principalmente de los taninos y las saponinas. Se evidencia que el uso en la dieta animal de plantas que contienen metabolitos secundarios puede dar como resultado una reducción en la producción de CH<sub>4</sub> positiva o negativa (Patra y Saxena., 2010). Esto depende de la cantidad de planta suministrada y de la cantidad de metabolitos secundarios que esta tenga. Por ello, es preciso continuar en la búsqueda de plantas que ayuden en la mitigación de emisiones de CH<sub>4</sub> del ganado bovino y en determinar la cantidad adecuada de dichas plantas para un óptimo resultado no solo en la disminución de dichas emisiones sino también en el bienestar y la nutrición del animal. De lograrlo se estaría contribuyendo al desarrollo de una estrategia sustentable de mitigación de un potente gas de efecto invernadero, dicha estrategia no estaría basada en el uso de compuestos químicos de potenciales efectos nocivos para el animal o el medio ambiente.

#### **4. HIPÓTESIS**

El empleo de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* en pruebas *in vivo*, reducen la producción de metano en el rumen y no afecta la producción de leche del ganado bovino.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* sobre la emisión de metano y la producción de leche en el ganado bovino lechero.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el contenido de taninos y fenoles totales de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus*.
- Determinar si existen efectos sobre la producción de metano entérico por el ganado bovino con la inclusión en la dieta de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus*.
- Evaluar el efecto de la inclusión en la dieta de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* sobre la producción y la composición físico-química de la leche.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los procedimientos realizados con los animales experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Universidad Autónoma del Estado de México a los 24 días del mes de abril de 2015.

### **6.1 Área de estudio:**

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ganadería, Medio Ambiente y Energías Renovables, situado en la unidad de producción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en el Cerrillo Piedras Blancas, municipio de Toluca, Estado de México, cuya ubicación geográfica es 19°27'N y 98° 38' O, altura de 2,600 msnm, temperatura promedio de 14 °C y precipitación de 900 mm/año (INEGI, 2014).

### **6.2 Diseño experimental:**

Se usó un diseño experimental de cuadrado latino de 4x4 utilizando cuatro vacas de raza Holstein, en cuatro periodos y cuatro tratamientos (T). La dieta basal estuvo compuesta por ensilado de maíz con alfalfa en una proporción 50:50, además las vacas fueron suplementadas con 4 kg de concentrado (T1) dividido en dos comidas al día (mañana y tarde). El concentrado estaba compuesto por 48.7% de maíz, 20% de soya, 14.8% de canola, 14.7% de salvado y 1.8% de minerales. Los tratamientos consistieron en adicionar a la dieta 500 g, que representan aproximadamente el 3% del consumo diario del animal, de *P. dulce* (T2), *T. erecta* (T3) y *C. bipinnatus* (T4). Cada tratamiento se administró a cada vaca y todas las vacas pasaron por todos los tratamientos a lo largo del experimento. Se utilizaron cuatro vacas de raza Holstein, en su segundo tercio de lactación, con peso vivo aproximado de 553±72.4 kg y producción de leche de 17.0±3.0 l. La duración del experimento fue de 92 días, divididos en cuatro periodos experimentales de 23 días cada uno. Los primeros 15 días de cada periodo fueron de adaptación a la dieta y al equipo de medición, en los días restantes se realizaron las mediciones

de emisión de CH<sub>4</sub>. Se midió la producción de leche diariamente y su composición química se analizó en los días de medición con el equipo Lactichek™-01 (RapiRead, Page & Pedersen International Ltd. Hopkinton, Massachusetts). En la leche se midieron los contenidos de grasa, lactosa, proteína y sólidos no grasos (SNG). El peso corporal se midió al inicio y al final de cada periodo experimental. El consumo de materia seca (CMS) también se midió, para ello se pesó el alimento ofertado y rechazado diariamente durante todo el experimento. Cada semana se tomaron muestras de ensilado ofertado para su posterior análisis en laboratorio.

Las plantas utilizadas fueron secadas a la sombra durante ocho semanas para evitar la desnaturalización de los compuestos fenólicos (Makkar 1993), seguidamente se molieron y se adicionaron diariamente al concentrado ofertado asegurando que el animal consumiera la totalidad del mismo. Se tomaron muestras de cada planta para hacer los análisis de laboratorio correspondientes.

### **6.3 Selección de plantas.**

Las plantas seleccionadas para este estudio se eligieron de acuerdo a una serie de investigaciones realizadas por el equipo de trabajo (Martínez et al., 2011; Olivares et al., 2011; Olivares et al., 2013; Olivares et al., 2014; Mahmoud et al., 2015), donde se evaluaron dichas plantas como forraje consumido por el animal, producción de gas, disminución de la emisión de CH<sub>4</sub> in vitro entre otros, que dejaron ver el potencial de estas plantas como alimento para el ganado bovino. Las plantas fueron recolectadas en diferentes meses del año puesto que son estacionarias. *C. bipinnatus* y *T. erecta* se recolectaron en los meses de septiembre-octubre del 2014 en el centro del Estado de México (Toluca), y *P. dulce* fue recolectado al sur del Estado de México (Palmar chico) en el mes de mayo del 2015. Seguidamente se molieron y se adicionaron diariamente al concentrado ofertado asegurando que el animal consumiera la totalidad del mismo. Se tomaron muestras de cada planta para hacer los análisis de laboratorio correspondientes.

#### **6.4 Medición de la producción de CH<sub>4</sub> *in vivo*:**

Se midió la producción de CH<sub>4</sub> *in vivo* con ayuda de una cámara de respiración del tipo “Ventilated Head Box” de circuito abierto (Pedraza *et al.*, 2016), la cual cuenta con un generador de flujo de masas modelo FK 500 (Sable Systems International, las Vegas USA), ajustado para tomar de la caja de cabeza 480 litros de aire por minuto para llevar una submuestra de tres litros al analizador de CH<sub>4</sub> infrarrojo modelo MA-10 (Sable Systems International, las Vegas USA), el cual por medio de una interface modelo UI-2 (Sable Systems International, las Vegas USA), envía la lectura de producción de CH<sub>4</sub> expresada en volts por segundo por vaca a una computadora. En la figura 2 se muestra el Lay Out de lo anteriormente descrito. Al inicio de cada corrida se realizaba una calibración del equipo llevándolo a cero con un gas libre de CH<sub>4</sub>, en este caso se usó nitrógeno de alta pureza, seguidamente se colocaba una mezcla de gases con una concentración de gas CH<sub>4</sub> de 1,000 ppm, el analizador de CH<sub>4</sub> se consideraba calibrado cuando la lectura de este era de 1.0% de CH<sub>4</sub> (span) posteriormente se regresaba a cero para iniciar la corrida. Dicha calibración se realizaba al inicio de cada corrida. Posteriormente se ingresaba a cada una de las vacas a la Head Box por un periodo de 24 h, con descansos de 2 h por cada 8 h de medición. La oferta de alimento fue constante. Al obtener los datos del programa Expe Data se multiplicaban los volts por 0.2 para pasarlos a porcentaje de CH<sub>4</sub>, seguidamente con el flujo de aire y el área bajo la curva del mismo se determinó la producción de CH<sub>4</sub> emitida por cada animal.

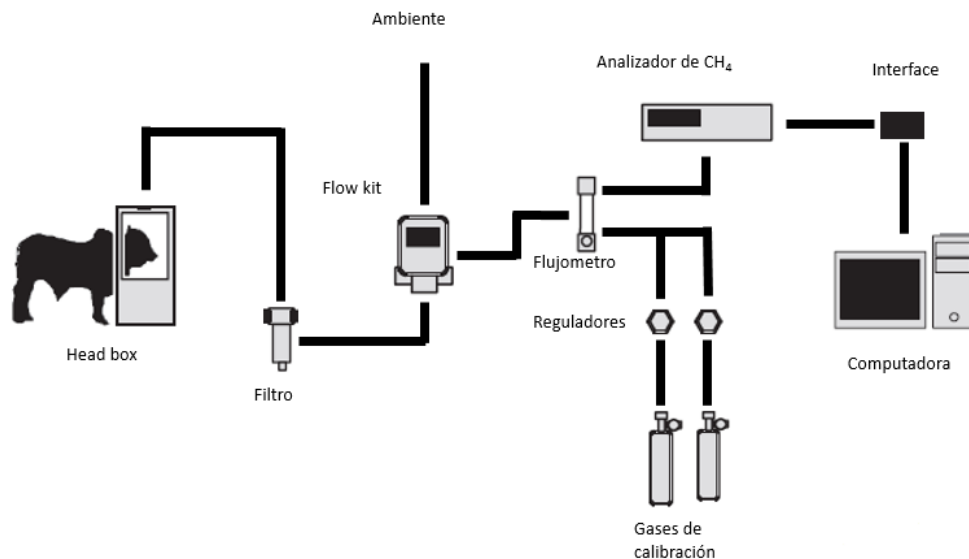


Figura 2: Lay Out del sistema de medición de CH<sub>4</sub>. Modificado de Suzuki *et al.* (2008).

### 6.5 Análisis químicos de muestras de alimentos:

El contenido de materia seca se determinó con una estufa para secado de forrajes a 105°C de temperatura, llevando una muestra de 25 g a peso constante. El contenido de nitrógeno (N) se determinó por el método de Kjeldhal y el contenido de proteína cruda se obtuvo al multiplicar la concentración de N por 6.25. Seguidamente se determinaron los contenidos de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) en un equipo ANKOM (Technology Corporation, Fairport, NY, USA), usando el método descrito por Van Soest *et al.* (1991). La determinación de la concentración de fenoles de las plantas experimentales se determinaron por el método Folin-Ciocalteu con polivinilpolipirrolidona (Makkar, 1993), donde el ácido tánico fue empleado para crear la curva de calibración. En el cuadro 1 se anotan los resultados obtenidos de estos análisis para cada uno de los componentes de la dieta y de las plantas.

### 6.6 Heces

Se pesó la producción total de heces y se colectaron muestras de éstas durante la medición de CH<sub>4</sub>, con las muestras colectadas se hizo un pool por cada una de las vacas. Posteriormente, fueron analizadas en el laboratorio de bromatología para



determinar su contenido de MS, para ello se colocaron 5 g de muestra en una estufa a 105°C hasta alcanzar un peso constante. Posteriormente, la muestra se metió a una mufla a 550°C por cuatro horas para obtener su contenido de cenizas, por último el contenido de materia orgánica (MO) se determinó restándole a la materia seca el contenido de cenizas. Los resultados obtenidos fueron usados para determinar la digestibilidad aparente de la dieta. La digestibilidad de la materia seca (DMD) fue calculada con la ecuación 1. Las muestras de ensilado fueron tomadas cada semana para su posterior análisis en el laboratorio.

$$DMD (\%) = ((DMI - FAe) / DMI) \times 100 \quad (1)$$

Donde DMI= consumo de materia seca en kg de DM, FAe= peso de las heces en kg de DM.

### **6.7 Análisis de resultados:**

Las variables de peso vivo, consumo, producción y composición de leche, digestibilidad aparente y de producción de CH<sub>4</sub> se sometieron a un análisis de varianza para un diseño de cuadrado latino 4x4. Los resultados se evaluaron con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = M + V_i + P_j + T_k + E_{ijk}$$

Y= variable de respuesta

M= medida general del modelo

V<sub>i</sub>= efecto debido a vaca

P<sub>j</sub>= efecto debido a período experimental

T<sub>k</sub>= efecto debido al tratamiento

E<sub>ijk</sub>= efecto debido al error experimental

Cuando existieron diferencias entre medias a un nivel de p<0.05 se aplicó una prueba de Tukey. Se empleó el programa de análisis estadístico Minitab V13.

## 7. RESULTADOS

----- Mensaje reenviado -----

**De:** Jorge Agudelo <editoranimalscience@gmail.com>

**Para:** Octavio Castelán <oaco2002@yahoo.com.mx>

**Enviado:** Lunes, 5 de septiembre, 2016 11:32:54

**Asunto:** Re: Manuscript Submission

Dear Dr. Castelán:

Thank you for your interest in publishing in RCCP.

According to our preliminary assessment, your study can be of interest for our readers and we look forward to publishing it after proper processing.

Nevertheless, your manuscript requires full editing of the English language. It must be re-submitted in ***Standard American English***.

We strongly recommend your manuscript to be edited by a native speaker of American English highly qualified for the task (hopefully, a researcher who has published scientific papers on this or related subjects). Otherwise, authors are encouraged to use a language-editing service from the list below\*:

Asia Science Editing: <http://www.asiascienceediting.com/>

Biomeditor: <http://www.biomeditor.com>

Bioscience Editing Solutions: <http://scienceditors.com>

BioScienceEditors: <http://www.bioscienceeditors.com>

BioScience Writers: <http://www.biosciencewriters.com/>

Editage: <http://www.editage.com>

Boston BioEdit: <http://www.bostonbioedit.com/>

English Manager Science Editing: <http://www.sciencemanager.com>

ESE - English Science Editing: <http://www.english-science.com>

Inter-Biotec: <http://www.inter-biotec.com>

International Science Editing: <http://www.internationalscienceediting.com/>

ScienceDocs: <http://www.sciencedocs.com>

Scriptoria: <http://www.script-edit.com>

SPI Publisher Services: <http://www.prof-editing.com/index.php>

SquirrelScribe.com: <http://www.squirrelscribe.com/>

Write Science Right: <http://www.writescienceright.com/>

*\*This is a partial list for informational purposes only. RCCP has no relationship with these services and neither endorses nor takes responsibility for their services. In addition, use of any of these services does not guarantee the acceptability of a manuscript for publication.*

Finally, the preparation of your manuscript has to follow RCCP format according to "INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS" on our website. E.g.

*Keywords should not be repeated in the title.*

*Wording in the abstract should correspond with that of Resumen.*

*P values should be verified (e.g, see line 42).*

Please let me know if you decide to comply with our request.

Best regards,

**Effect of *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* and *Cosmos bipinnatus* on methane emission by dairy cows**

**Efecto de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* sobre la emisión de metano y la producción de leche del ganado bovino.**

**Efeito de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* e *Cosmos bipinnatus* na emissão de metano por vacas leiteiras**

Gloria S Hernández Pineda<sup>1</sup>, AEA; Paulina E Pedraza Beltrán<sup>1</sup>, IAI, M en C; Mohammed Benaouda<sup>1</sup>, MVZ, M en C; José M Palma García<sup>2</sup> MVZ, Dr; Francisca Avilés Nova<sup>3</sup>, IAZ, Dra; Luisa T Molina<sup>4</sup>, QUIM, PhD; Octavio A Castelán Ortega<sup>1\*</sup>, MVZ, PhD.

<sup>1</sup>*Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México*

<sup>2</sup>*Universidad de Colima. Colima.*

<sup>3</sup>*Universidad Autónoma del Estado de México. Unidad Temascaltepec, Estado de México*

<sup>4</sup>*Molina Center for Energy and Environment. La Jolla USA.*

## **Summary**

**Background:** in order to mitigate the environmental impact of cattle different studies have been conducted to assess the effect of herbaceous plants, with moderate tannin content, on methane ruminal production. **Objective:** the aim of the present work is to evaluate the effect of *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* and *Cosmos bipinnatus* on methane emission, milk yield and dry matter intake in dairy cattle. **Methods:** a 4 × 4 Latin square experimental design was used, where four multiparous Holstein cows of 553±72.4 kg live weigh, at their second lactation third and average milk yield of 17.3±3 kg/day were used. The experiment lasted 92 days divided into four experimental periods of 23 days each. All cows had free access to maize and alfalfa-silage in a proportion 50:50, 4 kg of concentrate/day and *ad libitum* access to water. The treatments consisted in supplementation of 0.5 kg/day of the

experimental plants, the cows in the control treatment did not receive any plant. Each cow received each treatment, one in each of four periods. **Results:** *C. bipinnatus* reduced significantly methane production in 16% ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control diet. Milk production, milk composition and dry matter intake were not affected ( $p > 0.05$ ) by the use of *C. bipinnatus* or the other plant species. **Conclusions:** the supplementation at low doses of *C. bipinnatus*, a shrub plant with moderate tannin content, showed potential to reduce ruminal methane production in dairy cows.

**Keywords:** methane, cattle, climate change, mitigation.

## Resumen

**Antecedentes:** para mitigar el impacto ambiental generado por la explotación ganadera se han realizado diferentes estudios sobre el uso plantas herbáceas con contenido moderado de taninos para reducir la producción de metano en el rumen. **Objetivo:** evaluar el efecto de *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* y *Cosmos bipinnatus* sobre la emisión de metano y la producción de leche en el ganado bovino. **Métodos:** se usó un diseño experimental de cuadrado latino 4 x 4. Se emplearon cuatro vacas raza Holstein, multíparas, con peso vivo aproximado de  $553 \pm 72.4$  kg, en segundo tercio de lactación, con una producción de leche de  $17.3 \pm 3$  La duración del experimento fue de 92 días, divididos en cuatro periodos experimentales de 23 días cada uno. Las vacas fueron alimentadas con ensilado de maíz-alfalfa en proporción 50:50 a libre acceso, 4 kg de concentrado/día y agua *ad libitum*. Los tratamientos consistieron en la suplementación de 0.5 kg/día de las plantas experimentales y un tratamiento control sin planta. Cada una de las vacas paso por cada tratamiento en los cuatro periodos. **Resultados:** *C. bipinnatus* mostró una disminución en la producción de metano del 16% ( $p < 0.05$ ) respecto a la dieta control. La producción y composición de leche y el consumo de materia seca no se vio afectado ( $p > 0.05$ ) por el uso de *C. bipinnatus* ni por las otras plantas. **Conclusiones:** la inclusión de plantas que contienen metabolitos secundarios en la dieta de los animales, como *C. bipinnatus*, a dosis bajas tienen potencial para mitigar la producción de metano.

**Palabras clave:** metano, ganadería, cambio climático, mitigación.

## Resumo

**Antecedentes:** a fim de mitigar o impacto ambiental do gado vários estudos foram realizados para avaliar o efeito das plantas herbáceas, com conteúdo moderado em taninos, sobre a produção ruminal do metano. **Objetivo:** o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* e o *Cosmos bipinnatus* na emissão do metano, a produção de leite e de ingestão diária de matéria seca pelo gado. **Métodos:** um desenho experimental do quadrado latino 4x4 foi usado, com quatro vacas da raça Holandesa, multíparas, de  $553 \pm 72.4$  kg, no seu segundo terço da lactação e rendimento médio de leite de  $17.3 \pm 3$  kg/dia. O experimento durou 92 dias e foi dividido em tinham acesso livre a milho e silagem de alfafa, numa proporção de 50:50, com 4 kg de concentrado por dia, com acesso a água ad libitum. Os tratamentos consistiram na ingestão de 0.5 kg por dia, com as plantas experimentais; as vacas no tratamento de controle não recebeu nenhuma planta, mais cada vaca recebeu cada tratamento, um em cada um dos quatro períodos. **Resultados:** o *C. bipinnatus* reduziu significativamente a produção de metano em 16% ( $p < 0.05$ ), em comparação com a dieta controle. A produção de leite, sua composição e o consumo de matéria seca não foram afetados ( $p > 0.05$ ) pelo uso de *C. bipinnatus* ou outras espécies de plantas. **Conclusões:** a ingestão com doses baixas de *C. bipinnatus*, que é uma planta arbustiva com um conteúdo moderado de taninos, mostrou ter potencial para reduzir a produção de metano ruminal, em vacas leiteiras.

**Palavras-chave:** metano, gado, mudança climática, mitigação

## Introduction

Methane (CH<sub>4</sub>) production increased considerably during the industrial age due to anthropogenic activities. The main sources of anthropogenic CH<sub>4</sub> are the rise in livestock production, extraction and use of fossil fuels and rise production. Agriculture contributes with approximately 13% of the total global emission of greenhouse gases (GHG) (IPCC, 2014), from which cattle is responsible of 53% (Charmley *et al.*, 2016). Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), CH<sub>4</sub> and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) are the gases that contributes mostly to the greenhouse effect, CO<sub>2</sub> is the most abundant and presently represents the major contribution to global warming. However, CH<sub>4</sub> is 28 times more potent in its global warming potential than CO<sub>2</sub>. N<sub>2</sub>O is less abundant and it is present in the atmosphere in very low quantities; its global

warming potential is 296 times higher than CO<sub>2</sub> and can remain in the atmosphere for approximately 114 years (Carmona *et al.*, 2005).

Several studies, mostly of *in vitro* experiments, on the effect of tanniferous plants on reducing rumen CH<sub>4</sub> production have been conducted in order to find natural alternatives to mitigate the environmental impact generated by the emissions of this GHG by the cattle industry (Cuartas *et al.*, 2013). However, the results are contrasting because in some cases a small reduction is observed whereas in others a large reduction potential was identified. In addition, there are very few studies where the effect of these plants on rumen CH<sub>4</sub> production and animal performance have been evaluated *in vivo*. For example, Naumann *et al.* (2013) observed a small CH<sub>4</sub> reduction of 3.2% and 0.5% in an experiment conducted to evaluate the *in vitro* the effect of two eco-types of *Acacia angustissima*: South Texas ecotype and Cross timbers ecotype with a condensed tannin content of 8.4% and 8.9%, respectively. Similarly, in a study conducted by Bhatta *et al.* (2009) to evaluate the effect of different tannins in their pure form on *in vitro* CH<sub>4</sub> production, it was observed that hydrolysable tannins reduced CH<sub>4</sub> production by only 0.6%, while a mixture of hydrolysable and condensed tannins reduced it by 5.5%. On the contrary, our group conducted an *in vitro* study to evaluate the potential of condensed tannins from *Tajetes erecta* for reducing CH<sub>4</sub> production, observing a reduction of 39% in comparison with the control diet (Andrade *et al.*, 2012).

Therefore, the objective of the present study is to evaluate the effect of *Pithecellobium dulce*, *Tajetes erecta* and *Cosmos bipinnatus* on reducing methane emission, milk production and dry matter intake in dairy cattle.

### **Materials and method**

All the experimental procedures were approved by the Committee on Bio-ethics and Animal Welfare of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) on the 24<sup>th</sup> of April 2015.

#### *Area of study:*

The experiment was conducted at the Laboratory for Research on Livestock, Environment and Renewable Energies of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the

UAEM, located in Toluca, State of Mexico at 19°27'N and 98° 38' W and 2,600 m a.s.l. The average temperature is 14 °C and rainfall is 900 mm/year (INEGI, 2014).

*Experimental design:*

A 4 × 4 Latin square experimental design was used, in which four multiparous Holstein cows of 553±72.4 kg live weigh, at their second lactation third and average milk yield of 18±3 kg/d were used. The experiment lasted 92 days divided into four experimental periods of 23 days each. All cows had free access to maize-alfalfa silage in a proportion 50:50, 4 kg of concentrate/d and *ad libitum* access to water. The concentrate was composed of 48.7% corn, 20% soja bean meal, 14.8% canola cake, 14.7% wheat bran and 1.8% of mineral premix. The chemical composition of the silage, the concentrate and experimental plants is shown in Table 1. The four treatments consisted of the supplementation of 0.5 kg DM/d/cow of each of the three experimental plants and the control; which was the diet alone with no experimental plant added. Each cow received each treatment, one in each of four periods. Before the beginning of the experiment, the plants were dried, over a period of 8 weeks, away from sun light to prevent denaturalization of phenolic compounds as indicated in Makkar, (1993). Once dried they were grinded (whole plant) and incorporated into the concentrate to assure that cows eat the entire daily ration offered. Samples of the ground experimental plants were collected for chemical analysis in the laboratory.

For each 23 days experimental period, 15 days were used for diet adaptation and the rest to measure CH<sub>4</sub> production, dry matter intake and digestibility of the diet. The cows were confined in individual pens of 4 × 4 m, equipped with drinkers and troughs, during the experiment. Milk yield was weighted daily during the whole 23 days period and milk composition was measured daily during the measuring period of eight days. A Lactichek™-01 (RapiRead, Page & Pedersen International Ltd. Hopkinton, Massachusetts) analyser was used to determine milk composition, which included fat, lactose, protein, non-fat milk solids contents. Body weight was taken once at the beginning and once at the end of each experimental period. Dry matter intake (DMI) was determined by weighting the silage and concentrate offered in the morning and collecting and weighting the orts the next morning. The difference between the offered feedstuff minus the orts was the daily intake.



Digestibility of the dry matter (DMD) was calculated as shown in equation 1. Samples of silage were taken every week for chemical analyses in the laboratory.

$$DMD (\%) = ((DMI - FAe) / DMI) \times 100 \quad (1)$$

Where: DMI=dry matter intake in kg of DM, FAe=faeces weight in kg of DM

*Methane production measurement:*

The CH<sub>4</sub> production was measured with a respiration chamber of the head-box type as in Pedraza *et al.* (2016). The chamber consists of seven components: 1. a head-box with a stainless steel frame and acrylic walls, floor, and ceiling; 2. a semi-circular stainless steel feeder; 3. an automatic drinking water bowl; 4. a hood made from reinforced canvas and cotton fabric; 5. an infrared (IR) CH<sub>4</sub> gas analyzer (MA-10), a mass flow generator (FK-500), and a data-acquisition system (Universal interface UI2), all from Sable System International (Las Vegas, Nevada, United States); 6. a carbon steel metabolic cage with a steel floor to collect faeces and urine; and 7. a computer to capture the data from the UI2. The CH<sub>4</sub> analyser measures emissions highly accurately over a wide range by combining noise amplification and signal processing with a computerized controller and digital filtering to provide a maximum resolution of 0.0001% to 0.01%. Before each run two calibrations of this instrument were performed: a zero calibration using high-purity N<sub>2</sub> (acquired from Praxair Inc., Mexico); the N<sub>2</sub> was first passed through a drying unit to remove moisture and then through the analyser at a flow rate of 0.3 L/min to obtain a reading close to zero. And, a calibration to a reference gas, which is also known as a span gas, was performed using a known CH<sub>4</sub> concentration gas (a mixture of 1000 ppm of CH<sub>4</sub> and high-purity N<sub>2</sub>). The span gas was passed through a dryer unit and then through the analyser (0.3 L/min) to obtain a reading corresponding to the concentration of CH<sub>4</sub> in the span gas.

Every run started at 10:00 h, the mass flow generator was set at 480 L/min and the analyser to measure CH<sub>4</sub> concentration every second and then the chamber was closed. The CH<sub>4</sub> emissions were measured for up to 24 h. The cows were removed from the chamber for milking at 6:00 h and 15:00 h, and each milking lasted 1.5 h, after which they were returned to the chamber. The diet was weighed before the beginning of the run, and all animals were given the same amount at the same time (9:00h and 16:00h). The next morning, the orts

were removed and weighed to calculate DMI. Diet samples were collected and kept in a freezer until laboratory analysis. At each time point, faeces and urine were collected and weighed at the end of the day. A sample of approximately 1 kg of faeces was obtained and kept frozen until laboratory analysis. Four runs were completed in each experimental period.

*Chemical analysis of the feed:*

Silage, concentrate and stool samples were dried in a forced air oven at 60 °C for 72 h until constant weight, ground, and passed through a 1mm sieve. The DM and organic matter (OM) contents were determined according to the procedures of the Official Methods of Analysis (AOAC, 2000). The nitrogen contents in the silage and concentrate was determined by the Kjeldhal method (AOAC, 2000), and subsequently multiplied by a factor of 6.25 to obtain the protein contents. The neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and lignin contents were determined by the method of Van Soest *et al.* (1992) with the use of an ANKOM A200 fibre analyzer (Technology Corporation, Fairport, NY, USA). The DM content in the silage was corrected using the equation proposed by Haigh (1995) to include the volatile solids in the DM. The concentration of total phenols in the experimental plants was determined by the Folin-Ciocalteu method and the tannin content by the polyvinylpolypyrrolidone method as described in Makkar (1993), where tannic acid was used to create the calibration curve. The total phenols and tannins concentration of the experimental plants is shown in Table 1.

Table 1. Chemical composition of the silage and concentrate; and chemical composition, total phenols and total tannin concentration of the experimental plants (all in g/Kg of DM, except DM, which is g/Kg).

<b>Item</b>	<b>Concentrate</b>	<b>Silage</b>	<i>Pithecellobium dulce</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Tajetes erecta</i>
<b>DM</b>	888.5	367.2	931.5	928.1	931.5
<b>OM</b>	826.4	890.8	852.8	821.7	846.6
<b>CP</b>	221.1	108.4	90.5	115.2	137.2
<b>NDF</b>	340.7	517.8	527.1	470.5	458.7
<b>ADF</b>	123.5	390.3	468.3	387.3	403.8
<b>Lignin</b>	40.2	102.2	184.0	96.2	76.4
<b>Hemicellulose</b>	217.2	127.5	58.7	83.2	54.9
<b>Celullose</b>	83.3	288.1	284.3	291.1	327.4
<b>Total phenols</b>			12.6	90.7	32.7
<b>Total tannins</b>			14.7	71.7	73.0

DM dry matter, OM organic matter, CP crude protein, NDF neutral detergent fibre, ADF acid detergent fibre.

*Analysis of results:*

The experimental variables were analysed by analysis of variance for a Latin square experimental design as shown in equation 2. The Tukey's test was applied if differences between treatments were observed. The general linear model command of Minitab (2003) v14 was used. A multiple correlation analysis between all variables was also run in order to find associations that help to explain CH<sub>4</sub> production. Minitab was also used for this analysis.

$$Y_{ijk} = M + C_i + P_j + T_k + E_{ijk} \quad (2)$$

Y= response variable

M= general mean

V<sub>i</sub>= effect due to the cow, i=1:4

P<sub>j</sub>= effect due to the experimental period, j=1:4

$T_k$  = effect due to the treatment,  $k=1:4$

$E_{ijk}$  = effect due to the experimental error

## Results

Table 2 shows the effect of the experimental plants on DMI, DMD, milk yield and CH<sub>4</sub> production. Results show that no significant differences ( $p>0.05$ ) were observed between the control and the treatments for all the variables but CH<sub>4</sub> production. The treatment with *C. bipinnatus* reduced CH<sub>4</sub> production in 98.5 L/d (<16%) in relation with the control ( $p<0.05$ ), whereas *P. dulce* increased in 4% also in relation with the control. Similarly, *T. erecta* reduced numerically CH<sub>4</sub> production in 72.5 L/d (<11%) but it was not significant ( $p>0.05$ ). On the other hand, it was observed that all plants reduced numerically CH<sub>4</sub> production per kilogram of diet consumed in 22%, 21% and 14% for *T. erecta*, *P. dulce* and *C. bipinnatus*, respectively, in comparison with the control diet. However, although the reduction in the volume of CH<sub>4</sub> produced is large, it was not significant ( $p>0.05$ ). A similar trend was observed for the case of CH<sub>4</sub> production per kilogram of digestible dry matter intake (Table 2). In the same manner, *C. bipinnatus* reduced in 16% the volume of CH<sub>4</sub> produced per kg of milk yielded, however this difference is not significant ( $p>0.05$ ). It is important to note that all the productive variables like body weight, milk yield, DMI and DMD were not affected by any of the plants tested at the level they were supplemented.

Table 2. Effect of supplementation with *P. dulce*, *C. bipinnatus* and *T. erecta* on live weight, dry mater intake, dry matter digestibility, methane production, and milk yield.

Item	Treatment			
	Control	<i>Pithecellobium dulce</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Tajetes erecta</i>
Live weight, Kg	568±63 <sup>a</sup>	583±57 <sup>a</sup>	575±65 <sup>a</sup>	569±69 <sup>a</sup>
DMI, kg DM/d	14.8±3 <sup>a</sup>	20.2±6 <sup>a</sup>	15.1±4 <sup>a</sup>	16.8±4 <sup>a</sup>
DMD, %	58.9±3 <sup>a</sup>	63.9±11 <sup>a</sup>	60.2±15 <sup>a</sup>	62.3±12 <sup>a</sup>
CH <sub>4</sub> , L/d	613.5±97 <sup>a</sup>	635.5±105 <sup>a</sup>	515.3±41 <sup>ab</sup>	541.5±50 <sup>a</sup>
Milk, Kg/d	17.9±3 <sup>a</sup>	17.9±3 <sup>a</sup>	17.5±3 <sup>a</sup>	16.2±3 <sup>a</sup>
CH <sub>4</sub> , L/Kg of DMI	42.9±11 <sup>a</sup>	33.1±8 <sup>a</sup>	35.4±7 <sup>a</sup>	33.6±8 <sup>a</sup>
CH <sub>4</sub> , L/Kg of DMD	91.2±24 <sup>a</sup>	70.3±16 <sup>a</sup>	75.3±15 <sup>a</sup>	71.6±17 <sup>a</sup>
CH <sub>4</sub> , L/Kg of milk	34.9±8 <sup>a</sup>	36.8±12 <sup>a</sup>	29.8±3 <sup>a</sup>	33.9±4 <sup>a</sup>

Means between columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). DMI dry mater intake, DMD dry mater digestibility.

Milk composition was also not affected ( $p > 0.05$ ) by the experimental plants as shown in Table 3. The multiple correlation analysis showed significant positive associations between CH<sub>4</sub> L/day and DMI ( $r = 0.5$ ,  $p < 0.05$ ), and between DMD and CH<sub>4</sub> L/day (Hales *et al.*, 2012). On the contrary, a significant negative association ( $r = -0.64$ ,  $p < 0.001$ ) was observed between milk yield and CH<sub>4</sub> in L/Kg of milk (Garg *et al.*, 2013) No other significant association was observed between the studied variables.

Table 3: Effect of supplementation with *P. dulce*, *C. bipinnatus* and *T. erecta* on milk composition (%).

ITEM	Control	<i>Pithecellobium dulce</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Tajetes erecta</i>
Milk/DMI	0.9±0.2 <sup>a</sup>	0.9±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.3 <sup>a</sup>	1.1±0.4 <sup>a</sup>
Fat Kg/d	0.7±0.1 <sup>a</sup>	0.6±0.2 <sup>a</sup>	0.8±0.1 <sup>a</sup>	0.7±0.2 <sup>a</sup>
FCM kg/d	16.7±3.1 <sup>a</sup>	16.1±3.1 <sup>a</sup>	18.6±2.8 <sup>a</sup>	18.3±3.8 <sup>a</sup>
Fat %	4.2±0.70 <sup>a</sup>	3.7±0.10 <sup>a</sup>	3.9±0.86 <sup>a</sup>	4.0±0.55 <sup>a</sup>
Protein %	3.4±0.08 <sup>a</sup>	3.3±0.07 <sup>a</sup>	3.4±0.16 <sup>a</sup>	3.4±0.08 <sup>a</sup>
No fat solids %	9.0±0.21 <sup>a</sup>	8.8±0.20 <sup>a</sup>	9.1±0.41 <sup>a</sup>	9.0±0.21 <sup>a</sup>
Density %	1.031±0 <sup>a</sup>	1.031±0 <sup>a</sup>	1.031±0 <sup>a</sup>	1.031±0 <sup>a</sup>

FCM fat correction milk

## Discussion

The CH<sub>4</sub> production for individual cows in the control treatment are within the range reported for animals of similar live weight and intake (Haopeng *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2016). On the other hand, the percentage of CH<sub>4</sub> reduction achieved in the present work due to the inclusion of *C. bipinnatus* and *T. erecta* is comparable to the values reported in similar studies, even though the percentage of the plants in the diet and their tannin content, 3.5%, 3.0% and \_\_\_\_\_ respectively, are lower than in most studies. For example, Ives *et al.* (2015) evaluated the effect of condensed tannins from extract of *Acacia molissima* (50 g/Kg DM) on *in vitro* CH<sub>4</sub> production in five different species of ruminants, and found that tannins from *A. molissima* reduced CH<sub>4</sub> production in up to 12% in Holstein cows.

Similarly, Moreira *et al.* (2013) tested the effect of condensed tannins from *Leucaena leucocephala*, *Stylobium aterrimum* and *Mimosa caesalpiniaefolia* on CH<sub>4</sub> production in sheep, and found that condensed tannins (40 g/Kg of DMI) of *L. leucocephala* reduced CH<sub>4</sub> production in 25%, *S. aterrimum* in only 1%, while *M. caesalpiniaefolia* increased it in 7%. However, they had to rise the inclusion level of *L. leucocephala* and *S. aterrimum* in up to 82% and 69%, respectively, in order to achieve the reduction reported, which in the case of the former plant is almost nil. Further, at the inclusion level employed by Moreira *et al.*

(2013) it is difficult to elucidate if the mitigation effect can be attributed to the condensed tannins in the legumes alone, as they stated, to other secondary metabolites in the plants, or the chemical composition of the plants themselves. This is because it is well established that diets with high content of legumes produce less CH<sub>4</sub> due to their low fibre content than diets rich in grasses (Arndt *et al.*, 2014). Tavendale *et al.* (2005) who conducted an *in vitro* experiment to evaluate the CH<sub>4</sub> reducing potential of *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa* also reported a discrete reduction in CH<sub>4</sub> production. They observed that *M. sativa* reduced CH<sub>4</sub> production in 5% despite the fact it only had 0.2 g/kg of DM of condensed tannins, whereas *L. pedunculatus* with a higher concentration of condensed tannin (107 g/kg of DM) had no effect on CH<sub>4</sub> production. Indeed, it seems that the CH<sub>4</sub> reduction potential of tannins is not dose dependent because high doses do not always lead to less CH<sub>4</sub> production, whereas on the contrary low doses, as in the present study, seem to produce similar effects as those reported by the previous authors. This response pattern was elegantly demonstrate by Gomaa *et al.* (2016) in an *in vitro* experiment who established that the response is not lineal, but quadratic and that there is a significant interaction (p<0.01) between the plants species and the level of inclusion in the diet for CH<sub>4</sub> production. However, there are no many works published in the literature on the *in vivo* effect of *P. dulce*, *C. bipinnatus* and *T. erecta* on CH<sub>4</sub> production, which can give a better panorama of their methane mitigation potential.

In the *in vitro* experiments conducted by our research group, it was observed that a moderate level of inclusion of *C. bipinnatus* (19.3%) in the diet resulted in 20% less CH<sub>4</sub> produced (Mahmoud *et al.*, 2015). This value is similar to the one obtained in the present experiment but with a lower level of the plant in the diet (3.5%), confirming that the action of tanniferous plants on CH<sub>4</sub> production is not the same *in vitro* and *in vivo*. Similarly, Andrade *et al.* (2012) reported that *T. erecta* reduced CH<sub>4</sub> production in up to 39% despite the fact that it only has 1.3% of condensed tannins. Further, Gomaa *et al.* (2016) reported that the inclusion of *T. erecta* in the diet at a level of 19.3% reduce CH<sub>4</sub> production *in vitro* in 41.8%. Future experiments are recommended in order to elucidate the effect of tanniferous plants on CH<sub>4</sub> production, because most of the studies have been conducted *in vitro* and few *in vivo*. In relation of *P. dulce*, it was observed that it did not only reduced CH<sub>4</sub> production, but on the contrary increased. There are no studies on the effect of *P.*

*dulce* on CH<sub>4</sub> production, which can be used to explain this response. However, in an *in vitro* gas production experiment conducted by Olivares *et al.* (2013), it was observed that the inclusion of 30% of *P. dulce* in the diet resulted in 18% more gas produced after 24 h of incubation. These authors argue that the increment in gas production may be attributed to the high content of NDF, ADF and soluble carbohydrates in this plant species. Results for NDF and ADF for *P. dulce* in Table 1 suggest that this may have been the case in the present experiment, because this plant has the highest concentration of both fibre fractions. More gas produced in the *in vitro* systems represents more methane because approximately 18 to 30% of the gas within the flasks could be CH<sub>4</sub> (Bhatta *et al.*, 2007).

Finally, the 16% reduction in CH<sub>4</sub> production due to the supplementation of *C. bipinnatus* may not seem relevant in a single animal, however when extrapolated to large populations of bovines it may represent the mitigation of several gigagrams (Gg) of this greenhouse gas. Therefore, it is concluded that *C. bipinnatus* is a tanniferous plant that has potential to reduce methane production by cattle when supplemented at low doses.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the financial support from the Molina Center for Energy and the Environment (under UNEP Contract GFL-4C58), and the Universidad Autónoma del Estado de México (grant UAEM 3474/2013CHT), which made the present work possible. Miss. Gloria S. Hernández-Pineda thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the scholarship for her MSc.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they do not have any conflict of interest in relation with the work presented in the present manuscript.



## Bibliography

Arndt C, Powell JM, Aguerre MJ, Wattiaux MA, Performance digestion, nitrogen balance, and emission of manure, ammonia, enteric methane, and carbon dioxide in lactating cows fed diets with varying alfalfa silage-to corn silage ratios. *J. Dairy Sci.* 2014; 98: 418-430.

Andrade RE, Martínez AR, Castelán OA, Rios QJ, Pacheco OY, Estrada JG. Producción de metano utilizando plantas taníferas como substrato en fermentación ruminal *in vitro* y efecto de extractos fenólicos en la microflora ruminal. *Trop Sub Agro.* 2012; 15:301-312.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC): Arlington, VA. Official methods of analysis. 17<sup>th</sup> edn. 2000.

Bhatta R, Uyeno Y, Tajima K, Takenaka A, Yabumoto Y, Nonaka I, Enishi O, Kurihara M. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 2009; 92:5512–5522.

Bhatta R, Tajima K, Takusari N, Higuchi K, Enishi O, Kurihara M. Comparison of *In vivo* and *In vitro* Techniques for Methane Production from Ruminant Diets. 2007. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20 (7): 1049-1056.

Carmona JC, Bolívar DM, Giraldo LA. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2005; 18:49-63.

Charmley E, Williams R, Moate P, Hegarty R, Herd R, Oddy H, Reyenga P, Staunton K, Anderson A, Hannah M. A universal equation to predict methane production of forage-fed cattle in Australia. *Animal Production Science.* 2016; 56: 2-3.

Cuartas CA, Cardona JF, Naranjo R, Tarazona AM, Murgueitio RE, Chará D, Orozco, Ku VJ, Solorio SF, Flores EM, Solorio SB, Barahona RR. Contribution of intensive

silvopastoral systems to animal performance and to adaptation and mitigation of climate change. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 2014; 27:76-94.

Garg MR, Sheresia PL, Bhanderi BM, Phondba BT, Shelke SK, Makkar HPS. Effects of feeding nutritionally balanced rations on animal productivity, feed conversion efficiency, rumen microbial protein supply, parasitic load, immunity and enteric methane emissions of milking animals under field conditions. *Animal Feed Science and Technology.* 2013; 179: 24-35.

Gomaa Mohamed R, Castelán-Ortega OA, González-Ronquillo M, Arredondo-Ramos J, Ku-Vera JC, Tan-Molina L, Pedraza Beltrán P. Reduction of methane production from ruminant livestock using tropical tanniferous plants: a sustainable option for mitigation. In *Proceedings of the 6th Greenhouse Gas and animal Agriculture Conference, Melbourne, Australia, February 14 to 18, 2016.* PO 119.

Haopeng J, Tianhai Y, Wills DA, Alistair, Carson F, McDowell DA. Development of prediction models for quantification of total methane emission from enteric fermentation of Young Holstein cattle at. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 2014; 183:160-166.

Haopeng J, Tianhai Y, Wills DA, McDowell DA. Maintenance energy requirements of young Holstein cattle from calorimetric measurements at 6, 12, 18 and 22 months of age. *Livestock Science.* 2015;128:150-157.

Hales KE, Cole NA, MacDonald JC. Effects of increasing concentrations of wet distillers grains with solubles in steam-flaked, corn-based diets on energy metabolism, carbon-nitrogen balance, and methane emissions of cattle. *J. Anim. Sci.* 2013; 91:819-828.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (INEGI). (07 de Octubre de 2014). Obtenido de: <http://www.inegi.org.mx>.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Summary for Policymakers. En: Climate Change. Mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014.

Ives CV, Brandi RA, Franzolin R, Benetel G, Gisele MF, Adibe L, Abdalla, Helder L. *In vitro* methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. *Animal Feed Science and Technology*. 2015; 205:1-9.

Makkar HS, Bluemmel M, Borowy, NK, Becker K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1993; 61:161–165.

Mahmoud R, Ronquillo GM, Arredondo RJ, Molina .L, Castelán OO. Potentiality of five tanniferous plants for reducing methane production in the rumen. *Ital J of Anim Sci*. 2015; 14:137-138.

Moreira GD, Tavares PM, Borges OB, Primavesi O, Longo C, McManus C, Abdalla A, Louvandini H. Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. *Trop Anim Health Prod*. 2013; 45:879-882.

Naumann DH, Tedeshi LO, Muir JP, Lambert BD, Kothmann MM. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane production *in vitro*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2013; 50:154-162.

Niu M, Appuhamy JADRN, Leytem AB, Dungan RS, Kebreab E. Effect of dietary crude protein and forage contents on enteric methane emissions and nitrogen excretion from dairy cows simultaneously. *Animal Production Science*. 2016; 56:312-321.

Olivares PJ, Avilés NF, Albarran PB, Castelán OO, Rojas HS. Nutritional quality of *Pithecellobium dulce* and *Acacia cochliacantha* fruits, and its evaluation in goats. *Livestock Science*. 2013; 154:74-81.

Pedraza-Beltrán PE, Hernández-Pineda GS, Benaouda M, González-Ronquillo M, Arredondo-Ramos J, Ku-Vera JC, Zaragoza-Guerrero R, Molina TL, Castelán-Ortega OA. Construction and operation of the first low cost ventilated-hood system for methane measurements in cattle in Mexico. In Proceedings of the 6th Greenhouse Gas and Animal Agriculture Conference, Melbourne, Australia, February 14 to 18, 2016. PO 07.

Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood TG, Sivakumaran S. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus Pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*. 2005; 124:403-419.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1992; 74:3583-3597.

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

El volumen de producción de CH<sub>4</sub> para las vacas en el tratamiento control se encuentra dentro del rango esperado para vacas con peso vivo y CMS similares (Haopeng *et al.*, 2014; Haopeng *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2016). El porcentaje de reducción en la emisión de CH<sub>4</sub> observado en el presente estudio es comparable a lo reportado en trabajos semejantes por otros autores aunque la concentración de las plantas en la dieta y de taninos en la misma es mucho menor a la reportada. Por ejemplo, Ives *et al.* (2015) evaluaron la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro* y la tolerancia a taninos condensados en cinco especies diferentes de rumiantes, empleando extracto de *Acacia molissima* como fuente de taninos a dosis de 50 g/kg MS encontrando que los taninos condensados reducen la emisión de CH<sub>4</sub> hasta en un 12% para bovinos de raza Holstein. Así mismo, Moreira *et al.* (2013) utilizaron *Leucaena leucocephala*, *Stylobolium aterrimum* y *Mimosa caesalpiniaefolia* administrados como suplemento alimenticio en ovejas, ofertando estas plantas de tal manera que el animal consumiera 40 g de taninos condensados /kg de MS, encontrando que *Leucaena leucocephala* reduce la producción de CH<sub>4</sub> en un 25%, *S. aterrimum* en un 1% y *Mimosa caesalpiniaefolia* aumenta la producción de CH<sub>4</sub> en un 7%, sin embargo en los casos de la *L. leucocephala* y *S. aterrimum* fue necesario incluir 82% y 69% de las plantas en la dieta, respectivamente. No obstante, con los niveles de inclusión empleados por Moreira *et al.* (2013) es difícil establecer si la reducción en la producción de CH<sub>4</sub> se debió a los taninos condensados, como ellos lo aseguran, o bien a otros metabolitos secundarios de las plantas, o incluso a su propia composición química pues está bien establecido que las leguminosas producen menos CH<sub>4</sub> debido a su bajo contenido de fibra (Arndt *et al.*, 2014). Estos estudios demuestran que los metabolitos secundarios de las plantas como los taninos tienen potencial para reducir la producción de CH<sub>4</sub>, pero el presente estudio demuestra que tal vez no sea necesario incluir grandes dosis de las plantas para lograr una respuesta favorable pues como nuestros resultados demuestran que a bajos niveles de inclusión se obtuvo una respuesta similar a la de los autores anteriormente mencionados. Por otro lado, no existen muchos estudios sobre el efecto de *P.*

*dulce*, *C. bipinnatus* y *T. erecta* que puedan dar un mejor panorama sobre su potencial en la reducción de la producción de CH<sub>4</sub> entérico.

En los trabajos *in vitro* del equipo de investigación se han podido encontrar efectos importantes de estas plantas en la disminución de la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro*. Por ejemplo, al adicionar *C. bipinnatus* en un 19.3% de la dieta total ofrecida se redujo la emisión de CH<sub>4</sub> en un 20% (Mahmoud *et al.*, 2015). De igual manera Andrade *et al.* (2012) evaluaron *in vitro* la producción de CH<sub>4</sub> utilizando plantas taníferas, entre ellas *T. erecta* a diferentes niveles, encontrando que *T. erecta* reduce hasta en un 39% del CH<sub>4</sub> producido entéricamente por los rumiantes a pesar de contener solo 1.3% de taninos condensados. En cuanto a *P. dulce* no se conocen estudios sobre la producción de CH<sub>4</sub>, sin embargo Olivares *et al.* (2013) determinaron la producción de gas del fruto de *P. dulce*, hallando que a dosis de 30% de inclusión, a las 24 hrs la producción de gas aumento en un 18%, argumentando que este efecto se debe a los altos contenidos de FDN y FDA y altos niveles de carbohidratos solubles de esta planta. Este mismo efecto fue apreciado en el presente trabajo, al evidenciar que el consumo de *P. dulce* produjo más CH<sub>4</sub> respecto al control (4%), sin embargo también es preciso decir que este tratamiento tiene los contenidos más altos en FDN y FDA (Tabla 1) de los cuatro tratamientos ofertados en este experimento, asimismo fue el tratamiento que presento un mayor CMS, a pesar de esto no se presentaron diferencias significativas en los consumos ( $p < 0.05$ ), sin embargo es preciso mencionarlo puesto que las emisiones de CH<sub>4</sub> están directamente relacionadas con el CMS.

Es preciso mencionar que los taninos de distintas especies vegetales tienen propiedades físicas y químicas diferentes, las cuales pueden ser responsables de las variaciones en los efectos que se pueden encontrar en los diferentes estudios realizados con especies taníferas en rumiantes.

Finalmente, la reducción del 16% observada en el presente estudio para *C. bipinnatus* y aun en el caso de *T. erecta* donde la disminución fue del 11%, puede parecer no muy relevante en el contexto de un solo animal, sin embargo tiene un gran impacto desde el punto de vista ambiental puesto que si estos valores se

aplican a grandes poblaciones de bovinos, los niveles de mitigación podrían alcanzar varios gigagramos de CH<sub>4</sub>.

## 9. CONCLUSIÓN

La inclusión en la dieta animal de las dos plantas empleadas en esta investigación demuestra que no es necesario que los animales ingieran grandes cantidades de plantas con metabolitos secundarios para responder de manera positiva en la disminución de producción de CH<sub>4</sub>. *C. bipinnatus* a pesar de tener un contenido bajo de fenoles totales, mostro una respuesta de reducción del 16% sobre las emisiones de CH<sub>4</sub>, respecto a la dieta control. Por su parte *T. erecta*, a pesar de no tener una diferencia significativa en la reducción de la producción de CH<sub>4</sub>, junto con *C. bipinnatus* se consideran candidatas para ser evaluada a dosis diferentes a las del presente trabajo y así concluir cual podría ser la dosis indicada de estas plantas para su uso en la práctica.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aardenne J.A., Dentener J.G.J., Oliver C. G. M., Klein G. J. L. Resolution data set historical anthropogenic trace gas emissions for the period 1890-1990. Global Biogeochemical Cycles. 2001

Abreu A., Carulla J. E., Kreuzer M., Lascano C. E., Díaz T. E., Cano A., Hess H. D. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2003.16: 147-154.

Aluwong T., Wuyep P. A., Allam L. Livestock-environment interactions: Methane emissions from ruminants. African Journal of Biotechnology. 2011 10: 1265-1269.

Andrade RE, Martínez AR, Castelán OA, Rios QJ, Pacheco OY, Estrada JG. Producción de metano utilizando plantas taníferas como substrato en fermentación ruminal *in vitro* y efecto de extractos fenólicos en la microflora ruminal. Trop Sub Agro. 2012; 15:301-312.

Arndt C, Powell JM, Aguerre MJ, Wattiaux MA, Performance digestion, nitrogen balance, and emission of manure, ammonia, enteric methane, and carbon dioxide in lactating cows fed diets with varying alfalfa silage-to corn silage ratios. J. Dairy Sci. 2014; 98: 418-430.

Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Martinez, T.F., McAllister, T.A., Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions. J. Anim. Sci. 2007. 85, 1990–1996.

Benchaar C., Pomar C., Chiquette J. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modelling approach. *Can J Animal Science*. 2001. 19: 563-574.

Bhatta R, Uyeno Y, Tajima K, Takenaka A, Yabumoto Y, Nonaka I, Enishi O, Kurihara M. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.* 2009; 92:5512–5522.

Blas C., García-R. P., López M. C., Torres A. G. Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero. XXIV Curso de Especialización FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 2008.

Blummel M., Givens D. I., Moss A. R. Comparison of methane produced by Straw feed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an in vitro gas produce. *Animal feed Science and Technology*. 2005. 124: 379-390.

Bodas R, Prieto N, Garcia-Gonzales R, Andres S, Giraldez FJ, Lopez S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal feed Science and Technology*. 2012; 176:78-93.

Bonilla-Cárdenas J. A., Lemus-Flores C. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2012. 3: 215-246.

Carmona J. C., Bolívar D. M., Giraldo L. A. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel

ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2005.18: 49-63.

Cassandro M., Mele M., Stefanon B. Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Italian Journal of Animal Science*. 2013. 12: 450-458.

Charmley E, Williams R, Moate P, Hegarty R, Herd R, Oddy H, Reyenga P, Staunton K, Anderson A, Hannah M. A universal equation to predict methane production of forage-fed cattle in Australia. *Animal Production Science*.2016; 56: 2-3.

CMNUCC. Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. 2005. sexta recopilación y síntesis de las comunicaciones nacionales iniciales de las partes no incluidas en el anexo I de la convención. Disponible en: [http://unfccc.int/portal\\_espanol/esencial\\_background/feeling\\_the\\_heat/items/3303.php](http://unfccc.int/portal_espanol/esencial_background/feeling_the_heat/items/3303.php).

Cuartas CA, Cardona JF, Naranjo R, Tarazona AM, Murgueitio RE, Chará D, Orozco, Ku VJ, Solorio SF, Flores EM, Solorio SB, Barahona RR. Contribution of intensive silvopastoral systems to animal performance and to adaptation and mitigation of climate change. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*2014; 27:76-94.

Dijkstra J., Zijderveld S.M., Apajalahti J.A., Bannink A., Gerrits W.J.J., Newbold J. R., Perdok H.B., Berends H. Relationships between methane production and milk fatty acid profiles in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 2011. 167: 590-595.

EPA. Agencia Federal de Protección Ambiental. Methane and Nitrous Oxide Emissions from Natural Sources. EE.UU. Washington, DC, EE.UU. 2010.

Fernández C., López M. C., Lachica M. Description and function of a mobile open-circuit respirometry system to measure gas Exchange in small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 2012. 1-5.

Grainger C., Williams R., Clarke T., Wright AD., Eckard RJ. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Dairy Science* viabilidad. 2010. 93: 2612-2619.

Goel G, Makkar HPS, Becker K. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 105: 770-777.

Guimaraes B. P. M., Berchielli T. T., Beelen R., Filho J. A., Oliveira S. G. Characterization of condensed tannins from native legumes of the Brazilian northeastern semi-arid. *Revista de Ciências Agrícolas (Piracicaba, Brazil)*. 2006. 13: 522-528.

Guo YQ, Liu JX, Lu Y, Zhu WY, Denman SE, MCSweeney CS. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 47:421-426.

Hartmann T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 2007;68: 2831-2846.

Haopeng J, Tianhai Y, Wills DA, Alistair, Carson F, McDowell DA. Development of prediction models for quantification of total methane emission from enteric

fermentation of Young Holstein cattle at. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2014; 183:160-166.

Haopeng J, Tianhai Y, Wills DA, McDowell DA. Maintenance energy requirements of young Holstein cattle from calorimetric measurements at 6, 12, 18 and 22 months of age. *Livestock Science*. 2015; 128: 150-157.

Holtshausen, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R., Benchaar, C., 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 2809–2821.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (07 de octubre de 2014). Obtenido de: <http://www.inegi.org.mx>.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Summary for Policymakers. En: *Climate Change. Mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. 2014.

Ives CV, Brandi RA, Franzolin R, Benetel G, Gisele MF, Adibe L, Abdalla, Helder L. *In vitro* methane production and tolerance to condensed tannin in five ruminant species. *Animal Feed Science and Technology*. 2015; 205:1-9.

Johannes M., Lun P., Weisbjerg M. R, Hellwing A. L, Hvelplund T. The effect of different physical forms of rapeseed as fat supplement on rumen NDF digestion and methane emission in dairy cows. *Advances in Animal Biosciences*. *Animal*. 2011. 2: 516.

Johnson K., Huyler M., Westberg. H., Lamb B., Zimmerman P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. *Environ Science and Technology* 1994. 28: 359–362.

Johnson K. A., Huyler M., Pierce C.S., Westberg H., Lamb B., Zimmerman P. The use of SF6 as an inert gas tracer for use in methane measurements. *Animal Science*. 1992. 70: 302.

Johnson K. A., Westberg H. H., Michal J. J., Cossalman M. W. The SF6 Tracer Technique: Methane Measurement from Ruminants. In *Measuring Methane Production from Ruminants*. 1995. 73: 2483-2492.

Knapp J. R., Laur G. L., Vadas P. A., Weiss W. P., Tricarico M. J. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *American Dairy Science Association*. 2014.97: 3231-3261.

Kumar S., Carro M. D., Griffith G. W., Dagar S. S., Puniya M., Calabro S., Ravella S. R., Dhewa T., Upadhyay C. R., Sirohi S. K., Kundu S. S., wanapat M., Puniya A. K. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014.98: 31–44.

Leng R. A. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science*. 2014. 54: 519–543.

Mahmoud R, Ronquillo GM, Arredondo RJ, Molina. L, Castelán OO. Potentiality of five tanniferous plants for reducing methane production in the rumen. *Ital J of Anim Sci*. 2015; 14:137-138.

Makkar H.P.S. Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 2003. 49: 241-256.

Makkar HS, Bluemmel M, Borowy, NK, Becker K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1993; 61:161–165.

McCaughey W. P., Wittenberg K., Corrigan D. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can J Animal Science*.

Min, B.R., Pinchak, W.E., Anderson, R.C., Fulford, J.D., Puchala, R., Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *J. Anim. Sci*. 2006. 84: 2546–2554.

Montenegro J., Abarca S. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica.2000. En: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE – FAO – SIDE.

Montzka S. A., E. J., Butler J. H. 2011. Non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases and climate change. *Journal Nature*.

Moreira GD, Tavares PM, Borges OB, Primavesi O, Longo C, McManus C, Abdalla A, Louvandini H. Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. *Trop Anim Health Prod*. 2013; 45:879-882.

Moss A. R., Givens D. I. The effect of supplementing grass silage with soya vean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 2002. 42: 127- 143.

Mueller-Harvey, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric*. 2006. 86, 2010–2037.

Naumann DH, Tedeshi LO, Muir JP, Lambert BD, Kothmann MM. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes of ruminal methane production *in vitro*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2013; 50:154-162.

Niu M, Appuhamy JADRN, Leytem AB, Dungan RS, Kebreab E. Effect of dietary crude protein and foraje contents on enteric methane emissions and nitrogen excretion from dairy cows simultaneously. *Animal Production Science*. 2016; 56:312-321.

Olivares PJ, Avilés NF, Albarran PB, Castelán OO, Rojas HS. Nutritional quality of *Pithecellobium dulce* and *Acacia cochliacantha* fruits, and its evaluation in goats. *Livestock Science*. 2013; 154:74-81.

Patra, A. K., Saxena J. A. New perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 2010. 71: 1198–1222.

Pedraza-Beltrán PE, Hernández-Pineda GS, Benaouda M, González-Ronquillo M, Arredondo-Ramos J, Ku-Vera JC, Zaragoza-Guerrero R, Molina TL, Castelán-Ortega OA. Construction and operation of the first low cost ventilated-hood system for methane measurements in cattle in Mexico. In *Proceedings of the 6th*



Greenhouse Gas and Animal Agriculture Conference, Melbourne, Australia, February 14 to 18, 2016. PO 07.

Pellikaan W. F., Hendriks W. H., Uwimana G., Bongers L. J. G. M., Becker P.M., Cone J. W. A novel method to determine simultaneously methane production during in vitro gas production using fully automated equipment. *Animal Feed Science and Technology*. 2011. 168: 196–205.

Pen, B., Takaura, K., Yamaguchi, S., Asa, R., Takahashi, J. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* with or without b-1, 4 galactooligosaccharides on ruminal fermentation, methane production and nitrogen utilization in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007. 138: 75–88.

Piluzza G., Sulas L., Bullitta S. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science*. 2013. 69: 32-48.

Pinares C.S., Lassey K. R., Martin R. J., Molano G., Fernández M., MacLean S., Sandoval E., Luo D., Clark H. Assessment of the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique using respiration chambers for estimation of methane emissions from sheep. *Animal Feed Science and Technology* 2011. 167: 201–209.

Rymer C., Huntington J. A., Williams B. A., Givens D. I. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 2005. 124: 9–30.

Santillán S. N., García O.R.C., Benítez S. O., Limón N. V., Núñez M. Q., Schorr M. Greenhouse gases mitigation against climate change: United States-México border study case. Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Tesis de Maestría. 2013

Shimada Miyasaka Armando. 2009. Libro. Nutrición Animal. Pp 397.

Smith, A.H., Zoetendal, E.G., Mackie, R.I. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial. Ecol.* 2005. 50: 197–205.

Solomon S., Qin D., Manning M. 2007. Resumete técnico. IPCC. Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático.

Sosa A., Galindo J., Bocourt R. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 2007. 41: 105-114.

Steinfeld H., Pierre G., Tom W., Vincent C., Rosales M., Haan C. La larga sombra del ganado. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. Informe técnico. 2009. 87-139.

Storm I. L. D., Hellwing A. L. F., Nielsen N. I Madsen J. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. *Animals.* 2012. 183: 160-183.

Suzuki T., Phaowphaisal I., Pholsen P., Narmsilee R., Indramanne S., Nitipot P., Chaokaur A., Sommart K., Khotprom N., Panichpol V., Nishida T. In Vivo Nutritive Value of Pangola Grass (*Digitaria eriantha*) Hay by a Novel Indirect Calorimeter with a Ventilated Hood in Thailand. *JARQ.* 2008. 42: 123–129

Tomkins N.W., McGinn S.M., Turner D.A., Charmeley E. Comparison of open-circuit respiration chambers with a micrometeorological method for determining methane emissions from beef cattle a tropical pasture. *Animal Feed Science and Technology.* 2011. 167: 240-247.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1992; 74:3583-3597.

Waghorn, G.C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – progress and challenges.

Anim. Feed Sci. Technol. 2008. 147: 116–139.

Wina E., Muetzel S., Becker K. The impact of saponins or saponin-containing plant material on ruminant production. A review. Agricultural and Food Chemistry. 2005. 53: 8093-8105.

Williams C. M., Eun J. S., MacAdam J. W., Young A. J., Fellner V., Min B. R. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. Animal Feed Science and Technology. 2011.