

POTENCIAL DE EMISIÓN DE GASES EFECTO INVERNADERO DE PLANTAS FORRAJERAS POR FERMENTACIÓN ENTÉRICA

POTENTIAL OF GREENHOUSE GAS EMISSION BY FORAGE PLANTS FROM ENTERIC FERMENTATION

Sánchez-Santillán, P.²; Torres-Cardona, M.G.¹; Campos-Montiel, R.G.¹; Soriano-Robles, R.³; Fernández-Luqueño, F.⁴; Medina-Pérez, G.⁵; Del Razo-Rodríguez, O.E.¹; Almaraz-Buendía, I.^{1*}

¹Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo, México. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, México. ³Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México. ⁴Programa de Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía, CINVESTAV Saltillo, Coahuila de Zaragoza, Coahuila. ⁵Doctorado Transdisciplinario en Desarrollo Científico y Tecnológico para la Sociedad. CINVESTAV Zacatenco.

*Autor de correspondencia: isac@xanum.uam.mx

RESUMEN

Los rumiantes emiten metano (CH₄) y bióxido de carbono (CO₂) hacia la atmósfera, principalmente a partir de la fermentación de carbohidratos solubles y estructurales. Estos gases de efecto invernadero (GEI) favorecen el cambio climático y su concentración cada vez mayor en la atmósfera acelera el calentamiento global. Por ello, se han desarrollado diversas estrategias para disminuir su emisión, como el uso de modificadores metabólicos, la adición de aceites esenciales y de compuestos bioactivos de leguminosas arbóreas tropicales, entre otros. Sin embargo, las metodologías validadas para medir con mayor precisión la emisión de los GEI en rumiantes con frecuencia disminuyen el consumo de materia seca. El Panel Intergubernamental de Cambio Climático sugiere el uso de sus directrices para calcular la emisión de CH₄ por fermentación entérica en rumiantes, y para incrementar la precisión recomienda generar factores de emisión tomando en cuenta la composición química del sustrato y sus productos de fermentación. La digestión anaerobia y la técnica de producción de gas *in vitro* se han usado ampliamente para evaluar la degradación de sustratos y los productos de su fermentación. Así, estas técnicas también podrían usarse para generar factores de emisión de GEI y ser una alternativa más contra el calentamiento global.

Palabras clave: Rumiantes, metano, leguminosas tropicales, cambio climático, mitigación.

ABSTRACT

Ruminants emit methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) to the atmosphere, mainly from the fermentation of soluble and structural carbohydrates. These greenhouse gases (GHG) favor climate change and their increasingly higher concentration in the atmosphere also accelerates global warming. Therefore, various strategies have been developed to reduce their emission, such as the use of metabolic modifiers, the addition of essential oils and bioactive

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 2, febrero. 2018, pp: 40-45.

Recibido: diciembre, 2017. **Aceptado:** febrero, 2018.

compounds from tropical leguminous trees, among others. However, the methodologies validated to measure GHG emission by ruminants more precisely often decrease dry matter consumption. The Intergovernmental Panel on Climate Change suggests the use of its guidelines to estimate the emission of CH₄ from enteric fermentation in ruminants, and recommends generating emission factors taking into account the chemical composition of substrate and its fermentation products in order to increase precision. Anaerobic digestion and the *in vitro* gas production technique have been used widely to evaluate the degradation of substrates and fermentation products. Thus, these techniques may also be used to generate GHG emission factors and can be another alternative versus global warming.

Keywords: Ruminants, methane, tropical legumes, climate change, mitigation.

INTRODUCCIÓN

Las actividades ganaderas son una fuente potencial de emisión de gases de efecto invernadero (GEI), de los cuales los de mayor importancia son el bióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O). De estos GEI, el potencial de calentamiento global del CH₄ es de 21 a 25 veces el del CO₂ y se emite principalmente por fermentación entérica y fermentación de excretas (NASEM, 2016). Respecto a la fermentación entérica en rumiantes, la emisión de GEI cambia con respecto al sistema de producción, a las prácticas de manejo y a las estrategias implementadas en su alimentación. De hecho, dietas altas en forraje generan más CH₄ entérico que dietas altas en concentrado (Beauchemin *et al.*, 2007). Además de lo anterior, diversos factores afectan la emisión de CH₄ en rumiantes. Por ejemplo, este fenómeno disminuye al reducir el consumo de materia seca (MS), al aumentar la proporción de granos en dieta y su procesamiento, al sustituir henificados por ensilados dentro de la ración, al adicionar lípidos, ionóforos o ambos, al disminuir el tamaño de partícula, al adicionar modificadores metabólicos como el sulfonato 2-bromoetano (Hristov *et al.*, 2013), el 3-nitrooxypropanol (Romero-Pérez *et al.*, 2014) y al incluir algunos aditivos, como algunos compuestos secundarios de origen vegetal (saponinas, taninos, compuestos fenólicos, aceites esenciales), ácidos dicarboxí-

licos (fumarato, malato, acrilato), bacterias y levaduras (Beauchemin *et al.*, 2007; NASEM, 2016). Otro factor que afecta la emisión de CH₄ entérico en el ganado lechero es la etapa de producción, de manera que es mayor en vacas que se encuentran en plena lactancia, lo que sugiere una estrecha relación con el consumo de MS.

Sin embargo, a pesar de que diversos estudios están orientados a realizar estimaciones de emisión de CH₄ entérico en rumiantes, la metodología que se utiliza para ello no es uniforme, por lo que la información debe interpretarse cuidadosamente. La tecnología que se utiliza para realizar esas estimaciones es una limitante en muchos países en desarrollo y emergentes debido a la baja disponibilidad y acceso a los equipos e infraestructura que se describen en estudios realizados en países desarrollados. Por lo tanto, el objetivo de este artículo es realizar una breve revisión acerca de los métodos que se usan para medir la emisión de CH₄ por fermentación entérica en rumiantes, así como el potencial de emisión o mitigación de este gas de algunas plantas forrajeras, principalmente leguminosas.

Métodos para medir la emisión de CH₄ en rumiantes

La emisión de gases efecto invernadero (GEI) por fermentación entérica en rumiantes depende de muchos factores. Entre los más importantes se consideran la composición química del sustrato y el efecto en su fermentación *in vitro* y su digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, para que los datos de emisión de GEI por fermentación entérica en rumiantes sean más precisos, las metodologías que se utilizan deberían poder replicarse sin inconvenientes (NASEM, 2016). De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Powers *et al.*, 2014), el método estándar para medir la emisión de CH₄ originado por fermentación entérica en rumiantes es por cámaras de respiración calorimétricas. Además, existen otras técnicas útiles, como los cubos donde los rumiantes al comer introducen su cabeza y el CH₄ es detectado, indicadores internos como el hexafluoruro (SF₆), métodos micrometeorológicos (flujo horizontal integrado, flujo de gradiente), dilución de isótopos, túneles de polietileno, así como otras técnicas nuevas no validadas. Sin embargo, al aplicar estas metodologías es frecuente una reducción en el consumo de materia seca por el rumiante que no necesariamente refleja su productividad y consumo de alimento en explotaciones comerciales, sino por el contrario, se afecta el bienestar animal. Con base en lo anterior, también se han utilizado modelos para estimar la emisión de CH₄ entérico



en ganado lechero. Estos modelos están basados en el consumo de energía metabolizable (EM), fibra detergente ácido (FDA) y contenido de almidón en la dieta (Mills *et al.*, 2003, citado por Powers *et al.*, 2014).

Procedimientos para estimar el potencial de emisión de CH₄ de plantas forrajeras

La técnica de producción de gas *in vitro* se usa ampliamente para evaluar la digestibilidad de los alimentos en rumiantes y las estrategias de alimentación (Getachew *et al.*, 2005). Esta técnica también se ha utilizado para evaluar el efecto de aditivos, modificadores metabólicos, cambios en la proporción de ingredientes, y más, en las variables de fermentación, como lo reportaron Hatew *et al.* (2015) y Macome *et al.* (2017). Dentro de las variables que se originan por la fermentación de los alimentos está la formación de CH₄, la cual inicialmente no era una variable de interés, pero puede contribuir a estimar el potencial de emisión de CH₄ de los alimentos y de las estrategias de alimentación debido a que como lo describen Negussie *et al.* (2017), la mayoría de la metanogénesis (87 %) tiene lugar dentro del rumen. Acorde a Hristov *et al.* (2013), la composición química de los alimentos y su degradabilidad en rumen afectan la emisión de CH₄ debido a la proporción de ácidos grasos volátiles que se originan a partir de su fermentación. En este contexto, la producción de gas *in vitro* es una técnica disponible que han usado diversos investigadores puede ser una opción viable para caracterizar el potencial de emisión de los alimentos en rumiantes.

La digestión anaerobia es una técnica similar a la producción de gas *in vitro* y se usa ampliamente para medir el potencial de emisión de GEI de diversos sustratos usando diferentes inóculos, entre ellos, lodos anaerobios (Yan *et al.*, 2017) y heces de animales (Islas-Espinosa *et al.*, 2017). Sin embargo, esta variabilidad en los métodos sugiere analizar cuidadosamente los resultados como lo recomiendan Yan *et al.* (2017).

La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (UNFCCC, por sus siglas en inglés) requiere a los países proveer estimados de todas las emisiones de GEI y sus incertidumbres usando las directrices del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC, 2006). En estas directrices, la mayoría de la información generada para estimar la emisión de CH₄ a partir de la fermentación entérica utiliza los métodos Nivel 1 y Nivel 2. El Nivel 2 es un método más complejo que el Nivel 1 y se basa en un estimado del consu-

mo anual de energía total de un animal representativo que después lo multiplica por un factor de conversión de metano (Y_m) para categorías específicas del ganado. Para el Nivel 3, es necesario considerar la composición química de la dieta y la concentración de productos resultado de la fermentación, por lo que el IPCC sugiere a los países con grandes poblaciones de ganado generar factores de emisión para inventarios de emisión de GEI más precisos.

El IPCC provee un valor Y_m de 6.5 ± 1 % para vacas lecheras, vacunos alimentados fundamentalmente con desechos agrícolas y subproductos de baja calidad, vacunos en pastoreo y ovinos maduros; de 4.5 ± 1 % para corderos; y de 3 ± 1 % para ganado en finalización consumiendo menos de 900 g concentrado kg⁻¹ MS. Estos valores disminuyen al adicionar de 1 a 4 % de grasa en la dieta e incrementan al disminuir el porcentaje de grano (Beauchemin *et al.*, 2008; NASEM, 2016). Sin embargo, el uso de modificadores metabólicos y la adición de algunos componentes principales de los aceites esenciales en rumiantes pueden afectar esos valores. Por ejemplo, la producción de CH₄ disminuye en respuesta a la adición de aceite de ajo y de mezclas de aceites esenciales en experimentos *in vitro* (Benchaar y Greathead, 2011). Lo anterior sugiere que la precisión de la metodología del IPCC Nivel 2 es baja debido a que cada alimento tiene diferente potencial de emisión de GEI que puede ser alterado por la sinergia con otros alimentos y/o la adición de modificadores metabólicos o aceites esenciales, lo cual resulta en una gran incertidumbre para estimar los inventarios de emisión de estos gases (Escobar-Bahamontes *et al.*, 2017).

Uso de leguminosas arbóreas tropicales

El consumo de forrajes de baja calidad por rumiantes da como resultado mayor producción de metano (CH₄) (Melesse *et al.*, 2017) por el tipo de carbohidratos que lo constituyen. La adopción de nuevas opciones de mitigación de CH₄ como el uso de leguminosas arbóreas tropicales muestran ventajas nutricionales y ambientales (Patra, 2016). En el trópico hay especies de árboles que producen gran cantidad de forrajes de buena calidad, con alto contenido en proteína y minerales (Phesatcha y Wanapat, 2016; Melesse *et al.*, 2017) y en el trópico mexicano hay leguminosas arbóreas de interés para la alimentación de rumiantes. Las leguminosas arbóreas se usan como un recurso alternativo para superar las limitaciones de alimento y mitigar la emisión de CH₄ ruminal entérico mediante metabolitos secundarios (Saminathan

et al., 2015; Soltan *et al.*, 2017). Los metabolitos secundarios son compuestos bioactivos como polifenoles, taninos y oxidasas, mimosina, cianógenos y cumarinas (Phesatcha y Wanapat, 2016). Las leguminosas arbóreas se han evaluado muy poco en el contexto de su potencial para contribuir a la mitigación del cambio climático. Además, el potencial anti-metanogénico de los componentes fenólicos contenidos en las hojas de árboles o vainas tropicales no se han explorado completamente (Bhatta *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios se consideraban factores antinutritivos en la alimentación animal por su actividad antibacteriana y decremento en la disponibilidad de nutrientes (Patra y Jyotisna, 2010; Soltan *et al.*, 2017). Las leguminosas arbóreas del trópico contienen metabolitos secundarios que tienen potencial para modificar la fermentación ruminal, ya que mejoran la eficiencia energética (Anantasook *et al.*, 2013). Taninos, saponinas y monensina mitigan la producción de CH₄ (Soltan *et al.*, 2017; Saminathan *et al.*, 2017) porque actúan sobre los protozoarios y tienen efecto tóxico en las arqueas metanogénicas, lo que da como resultado menor síntesis de CH₄ en rumen por la simbiosis que existe entre los protozoarios y las arqueas metanógenas (Patra y Jyotisna, 2009; Huang *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011; Anantasook *et al.*, 2013; Cieslak *et al.*, 2013; Saminathan *et al.*, 2015; Phesatcha y Wanapat, 2016; Saminathan *et al.*, 2017; Soltan *et al.*, 2017). Además, los componentes de las leguminosas arbóreas tropicales ocasionan un cambio en la síntesis de propionato, lo que afecta la metanogénesis por la competencia reducida por el hidrógeno (Cieslak *et al.*, 2013).

Los taninos son compuestos polifenólicos de alto peso molecular solubles en agua con la capacidad de formar complejos con proteínas por los grupos hidroxilo fenólicos que contienen (Patra y Jyotisna, 2010; Cieslak *et al.*, 2012). Los taninos tienen un efecto directo sobre los microorganismos del rumen y un efecto indirecto sobre la digestión de las fibras, lo que disminuye la producción de hidrógeno (Cieslak *et al.*, 2012; Naumann *et al.*, 2013; Tavendale *et al.*, 2005). Así, el uso de los taninos de leguminosas arbóreas tropicales presenta un enfoque atractivo porque son productos químicos naturales en comparación de aquellos productos químicos como los antibióticos (Bhatta *et al.*, 2012). Los taninos se clasifican en hidrosolubles y condensados. Los taninos hidrosolubles son moléculas complejas con un poliol como núcleo central (como glucosa o glucitol) que están parcial o totalmente esterificados con un grupo fenólico. Estos son susceptibles de hidrólisis por ácidos, bases o estereasas que producen poliol (Patra y Jyotisna, 2009).

Los taninos condensados se conocen como proantocianidinas (Patra y Jyotisna, 2010; Huang *et al.*, 2011). El grado de mitigación de los taninos condensados va de 2 a 58 % según la concentración y composición del tanino y la especie de la que proviene (Saminathan *et al.*, 2015; Saminathan *et al.*, 2017). Una concentración de 5 a 30 g kg⁻¹ de taninos condensados muestran el potencial para mitigar la producción de CH₄ sin afectar la digestibilidad de la MS (Saminathan *et al.*, 2015). Actualmente, los taninos condensados se usan como aditivos para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal y el metabolismo de proteínas (Soltan *et al.*, 2017) ya que tienen un efecto bacteriostático sobre los metanógenos. Además, al mezclar taninos condensados con taninos hidrosolubles se potencializa la mitigación de CH₄ (Cieslak *et al.*, 2013).

Las saponinas son glucósidos de alto peso molecular compuestos de triterpeno o aglicona esteroideal unidos a uno o más azúcares, donde el número y tipo varía según la leguminosa arbórea tropical (Patra y Jyotisna, 2009). Las saponinas se unen a los esteroides de la membrana de los protozoarios causando destrucción celular, también actúan indirectamente sobre metanógenos al reducir el suministro del hidrógeno y eliminar protozoarios (Guo *et al.*, 2008; Anantasook *et al.*, 2013; Cieslak *et al.*, 2013).

La mimosina es un compuesto secundario que puede causar la muerte en los animales que no están adaptados a consumir hasta 30 % de la leguminosa arbórea tropical que los contenga. Este compuesto inhibe la síntesis de proteínas y el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos, además de ser un inhibidor de unión lenta a sustratos fenólicos dada su similitud estructural, por lo que podría estar relacionado a la disminución de CH₄ (Soltan *et al.*, 2017). Sin embargo, también puede ser tóxico para rumiantes no adaptados a consumirla manifestando alopecia, anorexia, baja peso, lesiones en el esófago, entre otras afecciones (Barros-Rodríguez *et al.*, 2014).

La leucaena (*Leucaena leucocephala*), arbusto o árbol longevo sin espinas utilizado en la alimentación de rumiantes durante la época de estiaje en el trópico (FAO, 2017), contiene de 24 a 30 % de proteína y de 2.3 a 12 % de mimosina en MS (Barros-Rodríguez *et al.*, 2014; FAO 2017). Leucaena



tiene propiedades antimetanogénicas (Saminathan et al., 2015; Soltan et al., 2017) debido a dos metabolitos secundarios responsables de sus actividades biológicas que pueden mejorar la digestibilidad de los nutrientes: taninos condensados y mimosina (Phesatcha y Wanapat, 2016; Soltan et al., 2017). Los taninos de las hojas y especialmente de los tallos reducen la digestibilidad de la MS y las proteínas, y el uso de dosis crecientes de taninos causan una reducción lineal de metanógenos y protozoarios. Sin embargo, la disminución de protozoarios no siempre se relaciona con la disminución de metanógenos (Cieslak et al., 2013).

El algarrobo (*Samanea saman*) es una planta leñosa de valor forrajero por su composición química, nutricional y antimicrobiana. El contenido de taninos condensados de su follaje se considera beneficioso en nutrición de rumiantes ya que reducen timpanismo, infecciones parasitarias y promueven el flujo de nitrógeno no amoniacal en intestinos (Ojeda et al., 2012; Milián-Domínguez et al., 2017). La maduración de la vaina se produce durante la época de sequía (febrero a mayo) y contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios: taninos condensados (7.9 %, formados por monoglicones, delphinidina y malidina) y saponinas (Galindo et al., 2014; Milián-Domínguez et al., 2017). Estos metabolitos tienen el potencial de alterar la fermentación ruminal mediante la supresión de protozoarios y metanógenos lo que lleva a disminuir la producción de CH₄ *in vitro* e *in vivo* (Patra y Jyotisna, 2010; Anantasook et al., 2013; Anantasook et al., 2014). El algarrobo también contiene cantidades moderadas de saponinas, esteroides, alcaloides, flavonoides, y resinas (Milián-Domínguez et al., 2017). Las vainas contienen saponinas que reducen la metanogénesis (Galindo et al., 2012) y flavonoides que actúan como antioxidantes (Milián-Domínguez et al., 2017). La corteza del árbol contiene alcaloides de gran diversidad química que son fisiológicamente activos en los animales, en tanto que el follaje y la corteza contienen mayor cantidad de metabolitos secundarios que las flores y frutos (Milián-Domínguez et al., 2017).

CONCLUSIÓN

La cantidad de gases efecto invernadero que se emiten a la atmósfera por fermentación entérica en rumiantes requiere mejorar e implementar factores de emisión y estrategias orientadas a la mitigación de estos gases. Las metodologías que se utilizan para medir la concentración y cantidad de estos gases a partir de la fermentación de sustratos no son uniformes,

por lo que los resultados pueden ser inconsistentes. Así, las estrategias implementadas en la nutrición y alimentación de rumiantes pueden no ajustarse a las directrices del IPCC, por lo que la generación de factores de emisión de GEI mediante procedimientos universales más simples pueden ser de gran utilidad. Algunos metabolitos secundarios de plantas con potencial forrajero, principalmente leguminosas, representan una opción para disminuir la emisión de metano entérico en rumiantes sin afectar la productividad.

LITERATURA CITADA

- Anantasook N., Wanapat M., Cherdthong A. 2013. Manipulation of ruminal fermentation and methane production by supplementation of rain tree pod meal containing tannins and saponins in growing dairy steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98: 50-55.
- Anantasook N., Wanapat M., Cherdthong A., Gunun P. 2014. Effect of tannins and saponins in *Samanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99: 335-344.
- Barros-Rodríguez M., Sandoval-Castro C. A., Solorio-Sánchez J., Sarmiento-Franco L. A., Rojas-Herrera R. K., Athol V. 2014. *Leucaena leucocephala* in ruminant nutrition. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17 (2): 173-183.
- Beauchemin K.A., Kreuzer M., O'Mara F., McAllister T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 21-27.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M., Martínez T.F., McAllister T.A. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 85: 1900-1906.
- Benchaar C., Greathead H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 338-355.
- Bhatta R., Mani S., Luna B., Sampath K. T. 2012. Nutrient content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2929-2935.
- Cieslak A., Szumacher-Strabel M., Stochmal A., Oleszek W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *The Animal Consortium* 7: 253-265.
- Cieslak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E., Szumacher-Strabel M. 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology* 176: 102-106.
- Escobar-Bahamondes P., Oba M., Kröbel R., McAllister T.A., MacDonald D., Beauchemin K.A. 2017. Estimating enteric methane production for beef cattle using empirical prediction models compared with IPCC Tier 2 methodology. *Canadian Journal of Animal Science* 97: 599-612.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2017. *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. Consulta: 30-octubre-2017. <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000158.htm>
- Galindo D.C., Hera R., Cairo J., Orta Y. 2014. *Samanea saman*, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo

- para animales de interés productivo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48: 205-212.
- Galindo J., González N., Scull I., Marrero Y., Sosa A., Aldana A.I. Moreira O., Delgado D., Ruiz T., Febles G., Torres V., La O O., Sarduy L., Noda A., Achang O. 2012. Efecto de *Samanea saman* (Jacq.) Merr., *Albizia lebbbeck* (L.) Benth y *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (material vegetal 23) en la población de metanógenos y en la ecología microbiana ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 46: 273-278.
- Getachew G., DePeters E. J., Robinso P. H., Fadel J. G. 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 547-561.
- Guo Y.Q., Liu J.X., Lu Y., Zhu W.Y., Denman S.E., McSweeney C.S. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47: 421-426.
- Hatew B., Cone J.W., Pellikan W.F., Podesta S.C., Hendriks W.H., Dijkstra J. 2015. Relationship between *in vitro* and *in vivo* methane production measured simultaneously with different dietary starch sources levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology* 202:20-31.
- Hristov A.N., Oh T., Firkins J.L., Dijkstra J., Kebreab E., Waghorn G., Makkar H.P.S., Adesogan A.T., Yang W., Lee C., Gerber P.J., Henderson B., Tricarico J.M. 2013. Special Topics: Mitigation of methane and nitrous oxide emissions of animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science* 91: 5045-5069.
- Huang X.D., Liang J.B., Tan H.Y. Yahya R., Ho Y.W. 2011. Effects of leucaena condensed tannins of differing molecular weights on *in vitro* CH₄ production. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 373-376.
- IPCC. 2006. 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Volume 4: Agriculture, Forestry and other land use. Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme. Eggleston H. S., Buendia L., Miwa K., Ngara T. Tanabe K. (eds). IGES, Japan.
- Islas-Espinoza H.M.A., Vázquez-Chagoyán J.C., Salem A.Z.M. 2017. Anaerobic cometabolism of fruit and vegetable wastes using mammalian fecal inoculums: Fast assessment of biomethane production. *Journal of Cleaner Production*. 141: 1411-1418.
- Macome F.M., Pellikaan W.F., Schonewille J.T., Bannink A., Laar H.V., Hendriks W.H., Warner D., Cone J.W. 2017. *In vitro* rumen gas and methane production of grass silages differing in plan maturity and nitrogen fertilisation, compared to *in vivo* enteric methane production. *Animal Feed Science and Technology* 230: 96-102.
- Melesse A., Steingass H., Schollenberger M., Holstein J., Rodehutsord M. 2017. Nutrient compositions and *in vitro* methane production profiles of leaves and whole pods of twelve tropical multipurpose tree species cultivated in Ethiopia. *Agroforestry Systems* 91: 1-13.
- Milián-Domínguez J.C., Iglesias-Monroy O., Valdés-Marquez H., Sanjudo-Ramos Y. 2017. Estudio fitoquímico integral del *Samanea saman* de la región occidental de Cuba. *Revista Cubana de Química* 29: 480-491.
- NASEM. 2016. Nutrient requirements of beef cattle, Eight Revised Edition. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Washington, D. C.: The National Academies Press. Doi: 10.17226/19014.
- Naumann H.D., Tedeschi L.O., Muir J.P., Lambert B.D., Kothmann M.M. 2013. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane production *in vitro*. *Biochemical Systematics and Ecology* 50: 154-162.
- Negussie E., Lehtinen J., Mäntysaari P., Bayat A. R., Liinamo A.-E., Mäntysaari E. A., Lidauer M. H. 2017. Non-invasive individual methane measurement in dairy cows. *Animal*, 11(5): 890-899.
- Ojeda A., Barroso J.A., Obispo N., Cegarra R. 2012. Composición química, producción de gas *in vitro* y astringencia en el follaje de *Samanea saman* (Jacq.) Merrill. *Pastos y Forrajes* 35: 205-218.
- Patra A.K. 2016. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science* 3: 39.
- Patra A., Jyotisa S. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96: 363-375.
- Patra A., Jyotisa S. 2010. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 24-37.
- Phesatcha K., Wanapat M. 2016. Tropical legume supplementation influences microbial protein synthesis and rumen ecology. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101: 552-562.
- Powers W., Auvermann B., Cole N.A., Gooch C., Grant R., Hatfield J., Hunt P., Johnson K., Leytem A., Liao W., Powell J.M. 2014. Quantifying greenhouse gas sources and sinks in animal production systems. *In: Quantifying Greenhouse Gas Fluxes in Agriculture and Forestry: Methods for Entity-Scale Inventory*. Department of Agriculture, Washington. DC. 606 pages.
- Romero-Pérez A., Okine E.K., McGinn S.M., Guan L.L., Oba M., Duval S.M., Beauchemin K.A. 2014. The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *Journal of Animal Science* 92: 4682-4693.
- Saminathan M., Gan H. M., Abdullah N., Wong C.M.V.L., Ramiah S.K., Tan H.Y., Sieo C.C., Ho Y.W. 2017. Changes in rumen protozoal community by condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology* 123: 41-53.
- Saminathan M., Sieo C.C., Abdullah N., Wong C.M.V.L., Ho Y.W. 2015. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on *in vitro* methane production and rumen fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 2742-2749.
- Soltan Y.A., Morsy A.S. Lucas R.C., Abdalla A.L. 2017. Potential of mimosine of *Leucaena leucocephala* for modulating ruminal nutrient degradability and methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology* 223: 30-41.
- Tan H.Y., Sieo C.C. Abdullah N., Liang J.B., Huang X.D., Ho Y.W. 2011. Effects of condensed tannins from leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 169: 185-193.
- Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.T., Sivakumaran S. 2005. 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* 123-124: 403-419.
- Yan H., Zhao C., Zhang J., Zhang R., Xue C., Liu G., Chen C. 2017. Study on biomethane production and biodegradability of different leafy vegetables in anaerobic digestion. *AMB Express* 7-27. doi: 10.1186/s13568-017-0325-1.