

Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano

Torres-Salado, N.; Sánchez-Santillán, P.[®]; Rojas-García, A.R.; Herrera-Pérez, J. y Hernández-Morales, J.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Universidad Autónoma de Guerrero. Cuajinicuilapa. Guerrero. México.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Vainas.
Dióxido de carbono.
Metano.
Cinética.
Fermentación.

ADDITIONAL KEYWORDS

Pods.
Carbon dioxide.
Methane.
Kinetics.
Fermentation.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 16.12.2016
Aceptado/Accepted: 14.03.2017
On-line: 15.01.2018
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
sanchezsantillanp@gmail.com

RESUMEN

La metanogénesis forma parte del metabolismo energético de los rumiantes; sin embargo, hay leguminosas que tienen características específicas, las cuales ayudan a reducir la producción de metano antropogénico. El objetivo fue determinar la producción de gases de efecto invernadero (GEI) *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. Los sustratos fueron vainas secas de *Enterolobium cyclocarpum*, *Samanea saman* y *Acacia cochliacantha*; así como vaina seca y hoja verde de *Guazuma ulmifolia* y *Leucaena leucocephala*. El biodigestor contenía 0.5 g de un tipo de sustrato y 50 mL de medio de cultivo incubado a 39 °C. En los biodigestores se determinó la cinética de producción de gas midiendo el desplazamiento de gas a las 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h para calcular volumen máximo de gas (Vm) y tasa de producción de gas (S). Los mL de gas desplazados se usaron para estimar los moles GEI a las 24, 48 y 72 h. Los moles de metano se calcularon a las 24, 48 y 72 h. El análisis estadístico fue un diseño completamente al azar. La vaina de *E. cyclocarpum* presentó mejor Vm y S ($P < 0.05$). La vaina de *S. saman* cuantificó menos ($P < 0.05$) Vm que *E. cyclocarpum*, pero S no presentó diferencias ($P > 0.05$). La vaina de *E. cyclocarpum* produjo 43.8 y 29.9 % más GEI y metano total que la vaina de *S. saman*. La producción total de GEI y metano de la vaina y hoja de *L. leucocephala* no presentaron diferencias ($P > 0.05$) y el metano representó en promedio 17 % de los GEI. Bajo estas condiciones se concluye: las vainas de *E. cyclocarpum* y *S. saman* tienen buenos parámetros de fermentación y la proporción de metano producido es menor comparado con el resto de las leguminosas evaluadas.

Greenhouse gas *in vitro* production of tree legumes from the Mexican dry tropic

SUMMARY

Methanogenesis is part of the energetic metabolism of ruminants, however there are legumes that have specific characteristics, which help reduce the production of anthropogenic methane. The objective was to determine the *in vitro* greenhouse gas (GHG) production of tree legumes from the Mexican dry tropics. The substrates were dry pods of *Enterolobium cyclocarpum*, *Samanea saman* and *Acacia cochliacantha*; as well as, dry pods and green leaf of *Guazuma ulmifolia* and *Leucaena leucocephala*. The biodigester contained 0.5 g of type substrate and 50 mL of incubated culture medium at 39 °C. In the biodigesters, the gas production kinetics were determine by measuring the gas displacement at 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48 and 72 h for calculate maximum gas volume (Vm) and gas production rate (S). The mL displaced gas was used for estimate GHG moles at 24, 48 and 72 h. The methane moles were calculated at 24, 48 and 72 h. Statistical analysis was a completely randomized design. The *E. cyclocarpum* pod showed better Vm and S ($P < 0.05$). The *S. saman* pod quantified less ($P < 0.05$) Vm than *E. cyclocarpum*, but S did not show differences ($P > 0.05$). *E. cyclocarpum* pod produced 43.8 and 29.9 % more total GHG and methane than *S. saman* pod. The GHG and methane total production of *L. leucocephala* pod and leaf did not show differences ($P > 0.05$) and methane represented on average 17 % of GHG. Under these conditions concluded: The pods of *E. cyclocarpum* and *S. saman* have good fermentation parameters and proportion of methane produced is smaller with the rest of the evaluated legumes.

INTRODUCCIÓN

La emisión de gases de efecto invernadero (GEI) es tema de interés mundial por sus efectos sobre el calentamiento global y cambio climático (Hill et al. 2016, p. 1929; Kumar 2012, p. 1). El dióxido de carbono (CO₂) representa 76.7 % de los GEI antropogénicos (Kumar 2012, p. 1930). Las actividades agropecuarias generan 58 y 47 % de CO₂ y metano (CH₄) en el mundo. Lo que

representa alrededor de 14 % de las emisiones de GEI antropogénicos (Benchaar & Greathead 2011, p. 339). El CH₄ emitido por los rumiantes representa 49 % de la emisión global del metano antropogénico (Ganendra et al. 2015; Kumar 2012). La metanogénesis forma parte del metabolismo energético de los rumiantes y su producción es fundamental para comprender la productividad ganadera de los rumiantes. Las emisio-

nes de CH₄ se relacionan con microorganismos ruminales, proceso metabólico y digestión del alimento. El aumento de la productividad se mejora reduciendo la producción de CH₄ porque el hidrógeno metabólico se utiliza en la síntesis de acetato que en la síntesis de CH₄ (Goel & Makkar 2012, p. 730; Hill et al. 2016, p.1; Rodrigues et al. 2014, p. 7).

Las estrategias encaminadas a la reducción de metanogénesis ruminal representan una prioridad en países desarrollados donde tratan de disminuir sus emisiones de gases de efecto invernadero. En los países en desarrollo, la reducción de metanogénesis ruminal no es prioridad, pero su atención se centra en razones económicas. En el trópico, los rumiantes se alimentan de dietas de baja calidad y parte de la energía bruta ingerida se pierde por síntesis de CH₄ (Soliva et al. 2008, p. 65). Los enfoques para la reducción de CH₄ en rumiantes incluye la adición de suplementos alimenticios que reduzcan su producción, prácticas de manejo, selección genética de los animales, uso de bacteriófagos, etc. (Buddle et al. 2011; Ganendra et al. 2015). El contenido de fibra de forrajes como las leguminosas disminuyen la producción de metano por la presencia de saponinas y taninos condensados, bajo contenido de fibra, alta ingesta de materia seca y un paso rápido en rumen (Buddle et al. 2011, pp. 11-12; Ramírez-Briebesca 2014, p. 319). Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la producción de gases de efecto invernadero *in vitro* de cinco vainas y dos hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano para establecer los parámetros de su uso como suplementos alimenticios de rumiantes en pastoreo.

MATERIAL Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.

El estudio se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero; ubicado en Cuajinicuilapa, Guerrero (16°08" de latitud norte y 98°23" de longitud oeste).

Tabla I. Cinética de fermentación de gas *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano (Fermentation kinetics of gas *in vitro* of pods and leaves of legumes trees of Mexican dry tropic).

Tratamiento	Vm (mL/g)	S/h
<i>Guazuma ulmifolia</i> (hoja)	123.2 ^d	0.03 ^b
<i>Leucaena leucocephala</i> (hoja)	133.3 ^c	0.03 ^b
<i>Samanea saman</i> (vaina)	161.7 ^b	0.04 ^a
<i>Acacia cochliacantha</i> (vaina)	112.2 ^e	0.03 ^b
<i>Guazuma ulmifolia</i> (vaina)	112.6 ^e	0.03 ^b
<i>Leucaena leucocephala</i> (vaina)	126.0 ^d	0.03 ^b
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (vaina)	223.0 ^a	0.04 ^a
EE	6.28	0.001

^{abcd} Valores promedio que difieren en columna no comparten literal, Tukey (P < 0.05).
Vm: Volumen máximo de gas producido a las 72 h de incubación;
S: tasa de producción de gas; EE: error estándar de la media.

SUSTRATOS

Los sustratos fueron vainas secas de *Guazuma ulmifolia*, *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Samanea saman* y *Acacia cochliacantha*; así como, hojas frescas de *G. ulmifolia* y *L. leucocephala*. Las muestras se recolectaron en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México en el mes de marzo de 2015. Los sustratos se deshidrataron a 60 °C por 48 h en una estufa (RIOSSA® HCF-41, México) y se molieron con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA).

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo se compuso de dos tercios de una solución buffer-mineral reducida y un tercio de fluido ruminal fresco. El fluido ruminal fresco se obtuvo de un bovino provisto de cánula ruminal alimentado previamente en praderas con pasto pangola (*Digitaria decumbes*) y se filtró con una manta de cielo para eliminar las macropartículas de materia orgánica. El bovino se manejó de acuerdo al reglamento interno de bioética y bienestar de la UAGro con fundamento en las normas oficiales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-051-ZOO-1995). La solución buffer-mineral reducida contenía: 150 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (Sigma®) en 1000 mL de H₂O destilada], 150 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (Sigma®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck®) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich®) + 2.45 g MgSO₄ (Sigma®) + 1.6 g CaCl₂·2H₂O (Sigma®) en 1000 mL de H₂O destilada], 100 ml de solución al 8 % de Na₂CO₃ (Merck®), 100 mL de solución reductora [0.1 g L-cisteína (Sigma®) + 0.1 g Na₂S·9H₂O (Meyer®) + 2 mL NaOH (2N; Meyer®) en 100 mL de H₂O destilada] y 2 mL de resarzurina a 0.1 % (Sigma-Aldrich®) según Sánchez-Santillán et al. (2015, p. 4910).

BIODIGESTORES.

En un vial serológico (120 mL) se agregaron 0.5 g de un tipo de sustrato a peso constante y 50 mL de medio de cultivo, bajo flujo continuo de CO₂, para mantener condiciones de anaerobiosis. Los biodigestores se incubaron en baño maría a 39 °C por 72 h.

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

La producción de gas *in vitro* (5 muestras independientes por sustrato) se midió mediante el desplazamiento del embolo de una jeringa de vidrio (50 mL; BD Yale®, Brasil) a las 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h. Los mL gas producidos se usaron para obtener los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas (Vm, mL g⁻¹), y tasa de producción de gas (S, h⁻¹) con el modelo logístico $V_a = V_m / (1 + \exp(2-4 \cdot S \cdot (T-L)))$, descrito por Schofield y Pell (1995, p. 3457), usando el paquete estadístico SAS (2011).

PRODUCCIÓN DE GASES EFECTO INVERNADERO (GEI)

Los mL de gas producidos *in vitro* se utilizaron para calcular los moles de los GEI totales a las 24, 48 y 72 h mediante la ecuación de gases ideales $P V = n R T$; donde P = Presión en atmósferas (atm), R = Constante molar de un gas = 0.0821 L*atm/(K*mol), V = Volumen (L), T = Temperatura (°K) y n = moles de gas según la metodología de Rivas et al. (2012, p. 3).

GAS METANO (CH₄)

La producción de CH₄ (5 muestras independientes por sustrato) se midió a las 24, 48 y 72 h. Una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos se usó para acoplar un biodigestor con un vial trampa lleno de solución NaOH (2N) [80 g de NaOH (Merck®) en 1000 mL de H₂O destilada] modificado de la metodología de Stolaroff, Keith y Lowry (2008, p. 2729). La producción de CH₄ se tomó como los mL desplazados de la solución NaOH (2N), ya que el CO₂ reacciona con el NaOH formando Na₂CO₃ (Prada-Matiz and Cortés-Castillo, 2011). Los moles de CH₄ se calcularon mediante la ecuación de gases ideales $P V = n R T$ (Rivas et al. 2012, p. 3).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables se analizaron en un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron usando el procedimiento GLM (SAS Institute Inc. 2011). Los promedios se compararon con la prueba de Tukey (P<0.05). El modelo estadístico fue: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$; donde: Y_{ij} son las variables de respuesta en la repetición j , del sustrato i ; μ es la media general; τ_i es el efecto del i -ésimo tipo de sustrato; ϵ_{ij} es el error aleatorio del i -ésimo tipo de sustrato en la j -ésima repetición.

RESULTADOS

La vaina de *E. cyclocarpum* presentó el mayor promedio (P<0.05) dentro de la cinética de fermentación (Vm y S), lo que permite analizar que contiene mayor cantidad de carbohidratos fermentables que las demás vainas y hojas. La vaina de *S. saman* mostró menor (P<0.05) producción total de gas (Vm) que *E. cyclocarpum*, pero la tasa de producción de gas (S) entre ambas vainas no presentó diferencias (P> 0.05). Las hojas y vainas de *G. ulmifolia* y *L. leucocephala* no presentaron diferencias en S (p > 0,05); sin embargo, el Vm fue mayor (P<0,05) en las hojas que en las vainas de cada especie (Tabla II).

Aunque la producción de gases de efecto invernadero (GEI) a las 24 h no presentó diferencias entre tipo

de sustratos (p > 0.05); la producción de metano (CH₄) varió (P<0.05). La producción de CH₄ representó 41.6 % de los GEI en la vaina de *E. cyclocarpum* y 37.1 % en la vaina de *S. saman*. A las 48 h de fermentación las hojas de *G. ulmifolia* y *L. leucocephala* cuantificaron la mayor producción de GEI (P<0.05), ya que produjeron en promedio 0.78 mMol más que las vainas. El comportamiento de la producción de CH₄ contrasta con los GEI, ya que únicamente la vaina de *G. ulmifolia* produjo menor cantidad de CH₄ respecto al resto de sustratos (P<0.05). Mientras la producción de CH₄ a las 72 h de incubación no presentó diferencias (p > 0.05), la vaina de *E. cyclocarpum* produjo la mayor cantidad de GEI, seguida de la vaina de *L. leucocephala* (P<0.05; **Tabla I**).

La producción total de GEI y CH₄ fue mayor en la vaina de *E. cyclocarpum* seguida de la vaina de *S. saman*; la diferencia de producción entre estas vainas fue de 2.89 y 0.35 mMol de GEI y CH₄. La producción total de GEI y CH₄ de la vaina y hoja de *L. leucocephala* no presentaron diferencias (p > 0.05) y el CH₄ representó en promedio 17 % de los GEI. En contraste, la vaina y hoja de *G. ulmifolia* presentaron diferencias en la producción total de GEI (P<0.05), pero no hubo diferencias en la producción total de CH₄ (p > 0.05). En promedio, la producción de CH₄ de las hojas evaluadas en el presente trabajo representó 16.7 % de los GEI (**Tabla II**).

DISCUSIÓN

La cinética de producción de gas *in vitro* se obtiene de una fermentación anaerobia de carbohidratos solubles y/o pared celular con microorganismos del rumen (Sánchez-Santillán et al. 2015, p. 4913; Schofield and Pell, 1995, p. 3459) y es una medida indirecta de la degradación de los sustratos (Lara et al. 2009, p. 276). Los valores de Vm y S (**Tabla I**) son una consecuencia de la composición química bromatológica de los sustratos (Sánchez-Santillán et al. 2015, p. 4913) y el Vm producido se relaciona directamente con la degradabilidad de la materia seca (Saminathan et al. 2015, p. 2745). Pinos-Rodríguez et al. (2005, p. 754) reportaron que durante una cinética de fermentación primero se fermentan carbohidratos correspondientes al contenido celular y azúcares solubles, seguido por la fermentación de

Tabla II. Estimación parcial de gases efecto invernadero de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano (Partial estimation of greenhouse gases effect of pods and leaves of legumes trees of Mexican dry tropic).

Tratamiento	Gas metano (mMol)				Gases efecto invernadero (mMol)			
	24 h	48 h	72 h	Total	24 h	48 h	72 h	Total
<i>Guazuma ulmifolia</i> (hoja)	0.22 ^c	0.43 ^a	0.16	0.81 ^c	3.13	2.38 ^a	0.52 ^c	4.94 ^d
<i>Leucaena leucocephala</i> (hoja)	0.19 ^c	0.43 ^a	0.27	0.89 ^c	3.57	2.44 ^a	0.39 ^d	5.21 ^c
<i>Samanea saman</i> (vainas)	0.62 ^b	0.42 ^a	0.21	1.24 ^b	4.64	1.67 ^d	0.53 ^c	6.59 ^b
<i>Acacia cochliacantha</i> (vainas)	0.21 ^c	0.35 ^{ab}	0.19	0.75 ^c	4.22	1.40 ^e	0.31 ^e	4.50 ^e
<i>Guazuma ulmifolia</i> (vainas)	0.31 ^c	0.29 ^b	0.19	0.79 ^c	4.15	1.41 ^e	0.31 ^e	4.56 ^e
<i>Leucaena leucocephala</i> (vainas)	0.27 ^c	0.38 ^a	0.18	0.84 ^c	4.31	1.85 ^c	0.62 ^b	5.20 ^c
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (vainas)	0.94 ^a	0.38 ^a	0.29	1.61 ^a	6.05	2.26 ^b	0.70 ^a	9.48 ^a
EE	0.05	0.01	0.01	0.05	0.25	0.071	0.02	0.28

^{abcd}Valores promedio que difieren en columna no comparten literal, Tukey (P<0,05).

EE: error estándar de la media.

los polisacáridos de la pared celular accesibles para los microorganismos y por último los carbohidratos estructurales unidos a lignina. Los resultados obtenidos de la producción de gas de la vaina y hoja de *L. leucocephala* son similares a lo reportado por Molina et al. (2013, p. 21); ya que reportaron una producción de 117.4 mL de gas g⁻¹MS.

La calidad del forraje y la baja producción de metano en la fermentación de leguminosas arbustivas tropicales se atribuye a menudo a su contenido de taninos condensados (Tiemman et al. 2008, pp. 1800-1801), pero las características de la fibra también son importantes. El contenido de lignina impide que se degrade la hemicelulosa. Los niveles de degradación de la hemicelulosa determinan la metanogénesis (Tiemman et al. 2008, pp. 1800-1801). Los sustratos evaluados se clasificaron en tres grupos ($P < 0.05$) por su producción total de CH₄ (**Tabla II**): a) vaina de *E. cyclocarpum*; b) vaina de *S. saman*; y c) resto de los sustratos evaluados. Conforme el tiempo de fermentación en los sustratos avanzó, la producción de CH₄ se incrementó por el tipo de carbohidratos fermentables en rumen que contienen los sustratos evaluados y sus productos finales después de la fermentación (Archimède et al. 2011, pp. 62-63; Johnson et al. 2000, pp. 112-113; Johnson & Johnson 1995, p. 2485; Ramírez et al. 2012, p. 105). La composición de la fibra y la metanogénesis están asociadas (Tiemman et al. 2008, pp. 1800-1801) porque durante las primeras 24 h se fermenta el contenido celular, donde la fermentación es más eficiente. A medida que inicia la fermentación de carbohidratos estructurales se obtiene ácido acético, CO₂ e H₂ como productos finales (Johnson et al. 2000, pp. 112-113; Saminathan et al. 2015, p. 2745). El CO₂ e H₂ son sustratos utilizados por archeas metanogénicas presentes en rumen (Carmona, Bolívar & Giraldo 2005, p. 54) para producir energía y CH₄, según la estequiometría de la glucosa en rumen (Carmona, Bolívar & Giraldo 2005, p. 54; Patra & Saxena 2010, pp. 8-9). Los niveles de CH₄ (**Tabla II**) producidos en el presente trabajo son menores a los reportados por gramíneas (Rivera et al. 2015, p. 8-9; Rodríguez et al. 2010, p. 254; Rodríguez & Fondevila 2011, pp. 6-7) como consecuencia de los diferentes metabolitos secundarios que contienen las leguminosas tropicales. La presencia de diferentes taninos y saponinas reducen la producción de CH₄ al inhibir el crecimiento de archeas metanogénicas o efectos indirectos sobre la población de protozoarios del rumen y bacterias celulolíticas principales proveedores de H₂ (Carulla et al. 2005, p. 964; Jayanegara et al. 2011, 238; Rodríguez et al. 2010, p. 256; Rodríguez & Fondevila 2011, pp. 65-68; Soliva et al. 2008, 66-67).

Bajo estas condiciones se concluye, las vainas de *E. cyclocarpum* y *S. saman* presentaron los mejores parámetros de fermentación y la mayor producción de gases de efecto invernadero comparado con el resto de los sustratos evaluados. Sin embargo, aunque produjeron la mayor cantidad de estos gases, la proporción de metano producido fue menor que el resto de las vainas, lo que reduce el potencial de calentamiento global.

AGRADECIMIENTOS

Cuerpo Académico UAGRO-CA-183 "Producción sustentable de rumiantes en el trópico".

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC 2005, 'Official Methods of Analysis' (18th Ed), Washinton D.C.: AOAC International.
- Archimède, H, Magdaleine, CM, Boval, M, Martin, C, Morgavi, DP, Lecomte, P, & Doreau, M 2011, 'Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 166-167, pp. 59-64.
- Benchaar, C & Greathead, H 2011, 'Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 166-167, pp. 338-355.
- Buddle, BM, Denis, M, Attwood, MT, Altermann, E, Janssen, PH, Ronimus, RS, Pinares-Patiño, CS, Muetzel, S & Wedlock, DN 2011, 'Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture', *The Veterinary Journal*, vol. 188, pp. 11-17.
- Carmona, JC, Bolívar, DM & Giraldo, LA 2005, '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*, vol. 8, no. 1, pp. 49-63.
- Carulla, JE, Kreuzer, M, Machmüller, A, Hess, HD 2005, 'Supplementation of *Acacia mearnii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep', *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 56, pp. 961-970.
- Ganendra, G, Mercado-García, D, Hernandez-Sanabria, E, Peiren, N, De Campeneere, S, Ho, A & Boon, N 2015, 'Biofiltration of methane from ruminants gas effluent using autoclaved aerated concrete as the carrier material', *Chemical Engineering Journal*, vol. 277, pp. 318-323.
- Goel, G & Makkar HPS 2012, 'Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins', *Tropical Animal Health and Production*, vol. 44, pp. 729-739.
- Hill, J, McSweeney, C, Wright, AG, Bishop-Hurley, G & Kalantar-Zedeh, K 2016, 'Measuring methane production from ruminants', *Trends in Biotechnology*, vol. 34, no. 1, pp. 26-35.
- Jayanegara, A, Wina, E, Soliva, CR, Marquardt, S, Kreuzer, M & Leiber, F 2011, 'Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 163, pp. 231-243.
- Johnson, KA & Johnson, DE 1995, 'Methane Emissions from cattle', *Journal of Animal Science*, vol. 73, pp. 2483-2492.
- Johnson, DE, Johnson, Ward, GM & Branine, ME 2000, 'Ruminants and other animals', In MAK Khalil (ed.), *Atmospheric Methane*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 112-133.
- Kuma, PA 2012, 'Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions', *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 184, pp. 1929-195.
- Lara, PE, Canché, MC, Magaña, H, Aguilar, E & Sanginés, JR 2009, 'Producción de gas *in vitro* y cinética de degradación de harina de forraje de morera (*Morus alba*) mezclada con maíz' *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 43, no. 3, pp. 273-279.
- Molina, BIC, Manuel, CJ, Montoya, S, Correa, LGA & Barahona, RR 2013, 'Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*', *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 8, no. 2, pp.15-31.
- Patra, AK & Saxena, J 2011, 'Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, pp. 24-37.
- Pinos-Rodríguez, JM, González, S, Mendoza, G, García, JC, Miranda, L, De la Cruz, GA & De Lerma, V 2005, 'Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios, y en la producción de vacas Holstein', *Interciencia*, vol. 30, no. 12, pp. 752-757.
- Ramírez-Bribiesca, JE 2014, 'Biomethane production and cleanup', *Encyclopedia Meat Science*, vol. 1, pp. 71-75.

- Ramírez, R, P Pizzani, G De Martino, D García, Z Linares, O Colmenares & Domínguez, C 2012, 'Estimación *in vitro* de gases con efecto invernadero en frutos y follaje de árboles de un bosque seco tropical de Venezuela', *Pastos y Forrajes*, vol. 35, no. 1, pp. 99-108.
- Rivas, MMI, MAP Cobos, PS Sánchez & Mila, AR 2012, 'Producción de CH₄, CO₂ y degradación *in vitro* de la materia seca de 5 ingredientes de uso común en la formulación de dietas para rumiantes', in ADeC Ley *et al* (eds), II Congreso Internacional y III Nacional de Microbiología Pecuaria, Agrícola y de Alimentos, Chiapas, México, pp. 327-334.
- Rivera, JE, IC Molina, G Donney's, G Villegas, J Charà & Barahona, R 2015, 'Dinámicas de fermentación y producción *in vitro* de metano en dietas de sistemas silvopastoriles intensivos con *L. leucocephala* y sistemas convencionales orientados a la producción de leche', *Livestock Research for Rural Development*, vol. 27, no. 4, pp. 1-15.
- Rodrigues, MAM, AL Lourenco, JW Cone, FM Nunes, AS Santos, JMM Cordeiro, CMV Guedes & Ferreira, MM 2014, 'Evaluation of the nutritive value of muiumba (*Baikiaea plurijuga*) seeds: chemical composition, *in vitro* organic matter digestibility and *in vitro* gas production', *SpringerPlus*, vol. 3, pp. 311.
- Rodríguez, R, M Mota, C Castillo & Fondevilla, M 2010, 'In vitro rumen fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum* and mixtures with browse legumes: effects of tannin contents', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 94, no. 6, pp. 696-705.
- Rodríguez, R & Fondevilla, M 2011, 'Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on *in vitro* microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 96, no. 5, pp. 62-769.
- Saminathan, M, CC Sieo, CMVL Wong & Ho YW, 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*, vol. 95, pp. 2742-2749.
- Sánchez-Santillán, P, M Meneses-Mayo, L Miranda-Romero, E Santellano Estrada & Alarcón-Zúñiga B 2015, 'Actividad fibrolítica y producción de gas por *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 en bagazo de caña', *Revista MVZ Córdoba*, vol. 20, pp. 4907-4916.
- SAS 2011. SAS/STAT Software. Version 9.3. Cary, NC SAS, USA: Institute INC.
- Scholfiel, P & Pell, AN 1995, 'Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses', *Journal of Animal Science*, vol. 73, no. 11, pp. 3455-3463.
- Soliva, CR, AB Zeleke, C Clement, HD Hess, V Fievez & Kreuzer M 2008, 'In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potential in the rumen', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 147, pp. 53-71.
- Stolaroff, JK, DW Keit & Lowr, GV 2008, 'Carbon dioxide capture from atmospheric air using sodium hydroxide spray', *Environmental Science & Technology*, vol. 42, pp. 2728-2735.
- Tiemann, TT, CE Lascano, M Kreuzer & Hess, HD 2008, 'The ruminal degradability of fibre explains part of the low nutritional value and reduced methanogenesis in highly tanniferous tropical legumes', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 88, pp. 1794-1803.
- Van Soest, PJ, JB Robertson & Lewis, BA 1991, 'Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition', *Journal of Dairy Science*, vol. 74, num 10, pp. 3583-3597.