

Evaluación de diferentes niveles de inclusión de plantas nativas de sabanas inundables sobre una dieta basal de *Brachiaria humidicola* y su efecto sobre la producción de metano *in vitro*

Vélez, O.M.¹*; Campos, R.¹; Sánchez, H.¹ y Giraldo, L.A.²

¹Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Colombia

²Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Laboratorio de Biotecnología ruminal- BIORUM. Colombia.

RESUMEN

Se evaluó el efecto sobre la producción de metano de la inclusión creciente (25, 50 y 75 %) de cinco plantas nativas de sabanas inundables (*Senna occidentalis*, *Enterolobium schomburgkii*, *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa* y *Ambrosia peruviana*), sobre una dieta base de *Brachiaria humidicola*. Los tratamientos fueron incubados anaeróbicamente con fluido ruminal a 39°C por 24 h y después del proceso de fermentación, se determinó la producción de gas, metano, ácidos grasos volátiles (AGV), amonio y degradación de la materia seca (MSD). La inclusión en la dieta de 50 y 75% de todas las plantas, incrementaron el contenido de amonio ruminal, con valores entre 189 - 282 mg/L. Ninguna de las plantas modificó la concentración de AGVT (44-62 mmol/L). La producción de metano no se redujo significativamente con ningún tratamiento ($p>0,05$), aunque con *S. occidentalis* (75%) este parámetro fue inferior en un 18%, además, se incrementó la MSD y los niveles de butirato, isobutirato y valerato. Con *E. schomburgkii* (75%), la metanogénesis también se redujo en un 15%, sin embargo, este efecto estuvo acompañado de una disminución en la MSD y producción de gas. En conclusión, ninguna de las plantas mostró potencial para reducir la producción de metano, no obstante, las especies se convierten en alternativas nutricionales útiles para complementar el aporte proteico de la dieta en los sistemas ganaderos ubicados en condiciones de sabanas inundables.

Evaluation of different inclusion levels of floodable savannas native plants on a *Brachiaria humidicola* basal diet and their effect on *in vitro* methane production

SUMMARY

The effect on methane production of increasing levels (25, 50 and 75%) of five native plants from the floodable savannas (*Senna occidentalis*, *Enterolobium schomburgkii*, *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa* y *Ambrosia peruviana*), on a *Brachiaria humidicola* based diet were evaluated. The treatments were anaerobically incubated with ruminal fluid at 39 °C for 24 h, after the incubation period, gas production, methane, volatile fatty acids (VFA), ammonia and dry matter degradation (DMD) were determined. The inclusion of 50 and 75 % of all plants in the diet, increased the ruminal ammonia content, with values between 189-282 mg/L. None of the plants modified TVFA concentration (44-62 mmol / L). Methane production was not significantly reduced with any treatment ($p>0,05$), although with *Senna occidentalis* (75%) this parameter was an 18% lower, in addition, DMD and butyrate, isobutyrate and valerate levels were increased. With *Enterolobium schomburgkii* (75%), methanogenesis was also reduced by 15%, however, this effect was accompanied by a decrease in DMD and gas production. In conclusion, none of the plants showed potential to reduce methane production, nevertheless, they become useful nutritional alternatives to supplement the dietary protein in the livestock systems located under floodable savanna conditions.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Fermentación *in vitro*.
Plantas antimetanogénicas.
Dosis.
Ruminantes.

ADDITIONAL KEYWORDS

In vitro fermentation.
Antimethanogenic plants.
Dose.
Ruminants.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 21.03.2016
Aceptado/Accepted: 14.02.2017
On-line: 15.07.2017
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
omvelez@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

En ruminantes, el metano es el principal gas de efecto invernadero que se produce a partir de la fermentación entérica de los alimentos. Este gas es conocido por contribuir con la destrucción de la capa de ozono y el calentamiento global (Broucek, 2014). La producción de metano ruminal además de generar un impacto ambiental negativo, también representa una pérdida

de 2-15% de la energía consumida por el animal, lo que conlleva a un uso ineficiente de la energía que es aportada en la dieta (Giuburunca *et al.*, 2014).

Entre las alternativas de mitigación natural de metano ruminal con mayor atención actualmente, se encuentra el uso de plantas y sus metabolitos secundarios, los cuales presentan propiedades bioactivas que permiten cambiar los patrones de fermentación y

a través de diferentes mecanismos de acción reducen la metanogénesis (Durmic y Blache, 2012; Bodas *et al.*, 2012; Patra y Saxena, 2010).

El efecto de los metabolitos secundarios sobre la producción de metano varía dependiendo del tipo de metabolito, concentración en la planta, la dosis y su interacción con la dieta base de los animales. En dosis moderadas, estos compuestos reducen la producción de metano sin afectar la fermentación de los sustratos, sin embargo en dosis altas, algunos metabolitos reducen la metanogénesis como consecuencia de inhibir casi en su totalidad la fermentación ruminal (Bodas *et al.*, 2012; Patra y Saxena, 2010). Bodas *et al.* (2008) encontraron que la inclusión de un 10% de *Rheum nobile* y *Carduus pycnocephalus* en una dieta base, redujo la producción de metano en más de 25%. Zmora *et al.* (2012) reportan reducciones entre 5 - 38% al incluir en la dieta de 25 a 50% de *Salvia officinalis* L. Zeleke *et al.* (2006) con una inclusión del 20% de las plantas *Acacia angustissima* y *Sesbania sesban* encontraron valores de metano entre 12-37% menores a la dieta control. Por su parte Li *et al.* (2014) demostraron que la planta *Eremophila glabra* la cual en altas dosis presenta efectos potencialmente dañinos para los rumiantes, puede ser suministrada hasta un 15% en la dieta, sin afectar parámetros de fermentación y reduciendo la producción de metano en un 32%.

Las sabanas inundables, presentes con más de 5 millones de hectáreas en países como Colombia y Venezuela, son de importancia para el desarrollo de la cría y levante de bovinos en pastoreo extensivo (Peñuela *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 1997). La base forrajera son especies vegetales (gramíneas y leguminosas) adaptadas a las condiciones adversas de inundación y sequía, las cuales garantizan la alimentación para el ganado durante el año (Peñuela *et al.*, 2011). Estudios previos indicaron que las plantas *Senna occidentalis*, *Enterolobium schomburgkii*, *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa* y *Ambrosia peruviana*, nativas de sabanas inundables, presentaron propiedades antimetanogénicas cuando fueron incubadas como único sustrato con líquido ruminal durante 24 h (Vélez *et al.*, 2015), no obstante, aún se desconoce si el efecto persiste bajo un escenario donde interaccionan con una dieta base. De esta manera, se hace necesaria la realización de estudios que permitan identificar las dosis requeridas de cada planta para alcanzar los efectos más favora-

bles sobre la fermentación. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes niveles de inclusión de las plantas *Senna occidentalis*, *Enterolobium schomburgkii*, *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa* y *Ambrosia peruviana* sobre una dieta basal de *Brachiaria humidicola* y su efecto sobre la producción de metano y otros parámetros fermentativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se realizó un recorrido por diferentes sistemas ganaderos ubicados en condiciones de sabanas inundables para recolectar muestras de hojas y tallos de las plantas *Senna occidentalis*, *Enterolobium schomburgkii*, *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa* y *Ambrosia peruviana*. También se tomaron muestras de la especie *Brachiaria humidicola*, la cual fue utilizada como sustrato durante las pruebas de fermentación debido a que es una especie que se encuentra bajo estas condiciones (Peñuela *et al.*, 2011) y además es usada como una de las principales fuentes de alimentación para bovinos en pastoreo.

Las muestras se recolectaron y almacenaron en bolsas negras de polietileno bajo refrigeración (4-6 °C) hasta su traslado al laboratorio donde se secaron en un horno de ventilación forzada a 60°C por 48 h y fueron molidas a través de un tamiz de 1 mm en un molino Wiley (Arthur H. Thomás Company. Philadelphia).

TRATAMIENTOS

Se evaluaron 3 niveles de inclusión (25, 50 y 75%) de 5 plantas sobre una dieta base (sustrato), en una prueba de fermentación *in vitro* durante 24 h. El sustrato estuvo compuesto por la especie *B. humidicola*, la cual se fue reemplazando con cada una de las plantas (*S. occidentalis*, *E. schomburgkii*, *G. jussiaeana*, *B. nemorosa* y *A. peruviana*) de acuerdo a los respectivos niveles de inclusión. De esta manera, las proporciones de reemplazo fueron: 25% (0,25 g/g MS), 50% (0,50 g/g MS) y 75% (0,75 g/g MS). La **tabla I** muestra algunas características botánicas y el valor nutricional de las plantas evaluadas.

FERMENTACIÓN *IN VITRO*

Para las pruebas de fermentación, se utilizó la técnica de producción de gases siguiendo la metodología

Tabla I. Composición nutricional y algunas características taxonómicas de las plantas estudiadas (Nutritional composition and some taxonomic characteristics of the studied plants).

	<i>B.h</i>	<i>B.n</i>	<i>E.s</i>	<i>A.p</i>	<i>S.o</i>	<i>G.j</i>
Constitución	Herbácea	Arbustiva	Arbórea	Herbácea	Herbácea	Herbácea voluble
Familia	Poaceae	Capparaceae	Mimosaceae	Asteraceae	Caesalpinaceae	Fabaceae
MS (g/Kg)	946	927,4	953,5	914,8	945,1	926,2
Proteína (g/Kg MS)	52,1	181,5	181,2	257,4	276,1	187,7
FDN (g/Kg MS)	699,8	439,8	416,6	443	224,1	456,2
EE (g/Kg MS)	12,8	21,8	49,8	47,5	34,1	19,5
Cenizas (g/Kg MS)	45,8	58,2	97,3	105,4	86,1	79,3

B.h: *Brachiaria humidicola*; *B.n:* *Belencita nemorosa*; *E.s:* *Enterolobium schomburgkii*; *A.p:* *Ambrosia peruviana*; *S.o:* *Senna occidentalis*; *G.j:* *Galactia jussiaeana*. MS: materia seca; FDN: fibra detergente neutra; EE: extracto etéreo.

propuesta por Theodorou *et al.* (1994). El inóculo se obtuvo de cuatro vacas Holstein canuladas al rumen que consumían una dieta a base de pasto kikuyo (*Penisetum clandestinum*). El fluido ruminal fue transportado al laboratorio en termos previamente estabilizados a 39°C, donde se filtró a través de bolsas de nylon con tamaño de poro de 53 µm y se saturó con CO₂. Durante la incubación, el líquido ruminal de cada animal se utilizó por separado y cada uno sirvió como repetición para el análisis estadístico.

Un día antes del ensayo, se pesaron y adicionaron 0,5 g de cada tratamiento en frascos de vidrio de 110 ml. Los tratamientos fueron incubados con 10 ml de fluido ruminal + 40 ml de medio de cultivo según Goering y Van Soest (1970). También se incluyeron tratamientos control (eg. inóculo + sustrato) y blancos (eg. inóculo) para corregir por los gases generados por los microorganismos presentes en el líquido ruminal (López *et al.*, 2007). En total se evaluaron 16 tratamientos (5 plantas* 3 dosificaciones + un control) con 4 repeticiones (inóculos), y tres blancos por inóculo para un total de 76 unidades de fermentación. Los frascos se sellaron anaeróticamente con tapas de caucho y agrafes de aluminio y se llevaron a una estufa de ventilación forzada a 39°C por 24 h.

VARIABLES EVALUADAS

Después de las 24 h de fermentación, se determinó: producción de gas, metano, pH, ácidos grasos volátiles (AGV), amonio y la degradación de la materia seca (MSD).

La presión originada por los gases producto de la fermentación se determinó usando un transductor digital de presión (T443A - Bailey y Mackey, Inglaterra) al cual se le acopló una aguja que fue insertada a través de la tapa de caucho de los frascos, indicando la presión en libras por pulgada cuadrada (PSI). Los datos de presión se utilizaron en un modelo de regresión cuadrático estimado en el laboratorio, para calcular el volumen de producción de gas corregido por la presión atmosférica.

Para determinar la producción de metano se tomaron muestras de los gases generados y se inyectaron en viales de 10 ml para luego ser analizados en un cromatógrafo de gases Shimadzu (GC-2014) con detector FID en estación de datos GC-Solution, una columna HP-Molsiv de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 12 µm de espesor de película. Se usó helio como gas de arrastre con un flujo ajustado a 37,9 ml/min. Las muestras se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo de forma manual con jeringas GasTight® de 1,00 mL y la producción de metano se estimó como proporción de la producción total de gas.

Los frascos fueron ubicados dentro de bandejas con hielo para detener la fermentación. Posteriormente se abrieron para medir el pH del medio de incubación con un pH-metro (Metrohm).

Para los AGV's (acetato, butirato, propionato, isobutirato, valerato) se tomaron muestras del sobrenadante (0,8 ml) y se mezclaron con 0,5 ml de una solución desproteinizante y acidificante (10% ácido metafosfórico y 0,06% ácido crotónico p/v en HCl 0,5

N). Seguidamente se centrifugaron (13 000 rpm por 12 minutos a 4°C) y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. Los AGV's fueron estimados en un cromatógrafo de gases Shimadzu (GC-2014) equipado con detector FID en estación de datos GC-Solution con autoinyector AOC-20is y una columna HP-FFAP de 25 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,5 µm de espesor de película. Las temperaturas de detección, puerto de inyección y detector FID fueron 260, 260 y 280°C respectivamente. Se utilizó helio como gas de arrastre a un flujo de 51,7 mL/min. La cuantificación se realizó mediante la comparación entre muestras problema y estándares (materiales de referencia certificados Dr. Ehrestorfer®).

El contenido de amonio se determinó siguiendo la metodología propuesta por la AOAC (2005). Una muestra de 5 ml del sobrenadante fue estabilizada con 5 ml de ácido clorhídrico (0,5 N) en tubos Falcon. Posteriormente, en una centrifuga (Biofuge Primo R Heraeus®) se centrifugaron a 4000 rpm durante 4 minutos a 4°C. El amonio se determinó usando un electrodo selectivo (ISE-NH₃-N, Metrohm) con el cual se realizó una curva de calibración, la cual sirvió para estimar la concentración de amonio de cada muestra.

Para la determinación de la MSD, el contenido de los frascos se filtró inmediatamente a través de crisoles filtrantes Schott Duran® (poro de 0,5 mm). Los residuos se secaron a 60 °C por 48 h. El porcentaje de MS degradada se estimó por diferencia de peso antes y después del proceso de fermentación.

Los resultados de los parámetros evaluados se expresan por unidad de materia seca degradada, dado que esta es la fracción disponible para el metabolismo corporal de los animales, y por tanto es la que más interesa (Dijkstra *et al.*, 2011).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental tuvo un arreglo completamente al azar, y los datos de cada parámetro evaluado (producción de gas, metano, pH, AGV's, amonio y la MSD) fueron sometidos a análisis de varianza de una vía, utilizando el software estadístico InfoStat (2013). Cuando se encontraron diferencias entre medias de tratamientos, se usó la prueba de promedios de Tukey (p<0,05). También se realizaron análisis de regresión lineal y cuadrática para evaluar el efecto de la dosificación de cada planta sobre los parámetros evaluados. Las regresiones se declararon significativas con un p<0,05.

RESULTADOS

En general, se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados para las variables producción de gas, metano, AGV (totales e individuales), amonio y la MSD (p<0,05). El pH no se vio afectado con la aplicación de los tratamientos (p>0,05), manteniéndose en un rango entre 6,44 y 6,63, apropiado para promover la actividad de la mayoría de microorganismos ruminales y por lo tanto una fermentación adecuada (Posada y Noguera, 2005). La **tabla II** muestra las características fermentativas que se obtuvieron

con la inclusión de cada una de las plantas evaluadas a la dieta base.

La degradación de la materia seca se incrementó linealmente ($p < 0,05$) con la adición de la especie *S. occidentalis* (entre 12 – 26%). Con la inclusión de 50 y 75% de las especies *A. peruviana* y *G. jussiaeana* en la dieta, también se incrementó la degradación con respecto al control ($p < 0,05$), mientras que la planta *E. schomburgkii* redujo linealmente ($p < 0,05$) este parámetro, presentando el valor más bajo con respecto al control, con la inclusión del 75% (36,25 Vs 44,17 %, - $p < 0,05$).

La producción de gas se redujo linealmente ($p < 0,05$) al suministrar en la dieta la planta *A. peruviana*. La inclusión de 75% de *E. schomburgkii* también causó efectos negativos en comparación con el control ($p < 0,05$). Las especies *B. nemorosa*, *G. jussiaeana* y *S. occidentalis*

presentaron valores de producción de gas similares a los encontrados en la dieta control (203-240 ml/g MSD - $p < 0,05$).

Los mayores volúmenes de metano se encontraron cuando se adicionó la planta *B. nemorosa* en todos sus niveles, y con la dosificación del 25% de *A. peruviana* ($p < 0,05$). Por su parte, los menores volúmenes de metano se obtuvieron con la adición del 75% de las especies *S. occidentalis* y *E. schomburgkii* (54 y 56 ml/g MSD), estos valores a pesar de que no mostraron diferencias estadísticas con la dieta control, estuvieron por debajo en un 18 y 15% respectivamente.

La producción de amonio se incrementó linealmente con la adición de las plantas *S. occidentalis*, *E. schomburgkii*, *A. peruviana* y cuadráticamente con *B. nemorosa* ($p < 0,05$). Para estas plantas, los mayores niveles de

Tabla II. Características fermentativas *in vitro* de cada una de las plantas evaluadas con sus respectivos niveles de inclusión (25, 50 y 75%) después de 24h de fermentación (In vitro fermentation characteristics of each of the evaluated plants with their respective inclusion levels (25, 50 and 75%) after 24 hours of fermentation).

Planta	Inclusión (%)	pH	MSD ² (%)	Producción gas (ml/g MSD)	Metano (ml/g MSD)	Amonio (mg/L)
<i>B.h</i> ¹	0	6,55 ^a	44,17 ^{ghi}	239 ^a	66 ^{ab}	110 ^e
	25	6,56 ^a	56,37 ^c	218 ^{abc}	71 ^{ab}	163 ^{de}
<i>S.o</i>	50	6,51 ^a	62,60 ^b	204 ^{abcd}	65 ^{ab}	258 ^{ab}
	75	6,45 ^a	69,80 ^a	203 ^{abcd}	54 ^b	282 ^a
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	0,0123	NS	NS	0,0220
	cuadrática	NS	NS	0,0476	NS	NS
<i>E.s</i>	25	6,50 ^a	42,75 ^{hi}	217 ^{abc}	64 ^{ab}	164 ^{de}
	50	6,63 ^a	39,04 ^{ij}	220 ^{abc}	66 ^{ab}	193 ^{cd}
	75	6,60 ^a	36,25 ⁱ	191 ^{bcd}	56 ^b	237 ^{abc}
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	0,0128	NS	NS	0,0062
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS
<i>G.j</i>	25	6,49 ^a	48,55 ^{efg}	234 ^a	64 ^{ab}	148 ^{de}
	50	6,55 ^a	51,54 ^{def}	231 ^{ab}	77 ^{ab}	145 ^{de}
	75	6,47 ^a	51,44 ^{def}	234 ^a	77 ^{ab}	189 ^{cd}
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	NS	NS	NS	NS
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B.n</i>	25	6,55 ^a	46,66 ^{fgh}	240 ^a	87 ^a	194 ^{cd}
	50	6,44 ^a	46,44 ^{fgh}	229 ^b	83 ^a	231 ^{abc}
	75	6,55 ^a	44,60 ^{gh}	230 ^b	87 ^a	235 ^{abc}
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	NS	NS	NS	NS
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	0,0312
<i>A.p</i>	25	6,53 ^a	49,15 ^{defg}	231 ^b	85 ^a	180 ^{cd}
	50	6,59 ^a	53,92 ^{cd}	182 ^{cd}	71 ^{ab}	200 ^{bcd}
	75	6,50 ^a	53,31 ^{cde}	169 ^d	64 ^{ab}	228 ^{abc}
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	NS	0,0408	NS	0,0409
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS
	E.E ³	0,05	1,03	8,01	5,2	12,22

¹*B.h*: *Brachiaria humidicola*; *S.o*: *Senna occidentalis*; *E.s*: *Enterolobium schomburgkii*; *G.j*: *Galactia jussiaeana*; *B.n*: *Belencita nemorosa*; *A.p*: *Ambrosia peruviana*.

²MSD: Materia seca degradada.

³Error estándar

NS: regresión lineal o cuadrática no significativa.

^{a,b}Medias en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

amonio se encontraron con las dosificaciones de 50 y 75%, con valores entre 193 – 282 mg/L, los cuales fueron superiores a los encontrados para el control (110 mg/L - $p < 0,05$). La especie *G. jussiaeana* solo incrementó los niveles de amonio con la dosificación del 75% (189 Vs 110 mg/L – $p < 0,05$).

En comparación con los valores obtenidos con la dieta control, ninguna de las plantas evaluadas y sus respectivas dosificaciones generaron cambios en las concentraciones de AGVT, a excepción de la dosificación del 50% de *S. occidentalis* que generó aumento en este parámetro (62 Vs 48 mmol/L – $p < 0,05$) (tabla III). El acetato fue similar en todos los tratamientos en estudio con respecto a la dieta control. El butirato se incrementó con la dosificación de *B. nemorosa* (lineal- $p < 0,05$) y *S. occidentalis* (lineal y cuadrático – $p < 0,05$), no obstante, se redujo con la adición de *A. peruviana* (lineal- $p < 0,05$). Las concentraciones de propionato fue-

ron similares entre los diferentes niveles de inclusión de las plantas experimentales y la dieta control, encontrándose valores entre 11,1 – 14,6 mmo/L. Los niveles de isobutirato se incrementaron linealmente con las plantas, *E. schomburgkii*, *G. jussiaeana* y *S. occidentalis* ($p < 0,05$), sin embargo, los incrementos solo fueron diferentes con respecto al control con esta última planta en todas sus dosificaciones ($p < 0,05$). Las proporciones de valerato se aumentaron con la inclusión creciente de las especies *S. occidentalis* (lineal y cuadrático – $p < 0,05$), *B. nemorosa* (lineal – $p < 0,05$), *G. jussiaeana* (lineal – $p < 0,05$) y *A. peruviana* (cuadrático – $p < 0,05$), observándose los mayores niveles con respecto al control, con la dosificación del 75% de *S. occidentalis* (1,31 Vs 0,37 mmol/L) y *B. nemorosa* (0,53 Vs 0,37 mmol/L).

Los diferentes niveles de inclusión de las plantas *S. occidentalis*, *E. schomburgkii*, *G. jussiaeana* y *B. nemorosa* no afectaron la relación acetato:propionato (A:P) en

Tabla III. Producción de ácidos grasos volátiles individuales y totales después de 24h de fermentación – mmol/L (Production of individual and total volatile fatty acids after 24 hours of fermentation – mmol/L).

Planta	Inclusión (%)	Acetato	Butirato	Propionato	Isobutirato	Valerato	AGVT ²	Relación A:P ³
<i>B.h</i> ¹	0	35,7 ^{abc}	3,2 ^{bc}	12,4 ^{abc}	0,18 ^c	0,18 ^d	48 ^{bc}	2,62 ^b
	25	39,3 ^{ab}	4,1 ^{abc}	13,9 ^{abc}	0,32 ^b	0,40 ^c	58 ^{ab}	2,84 ^{ab}
	50	42,1 ^a	4,6 ^{ab}	14,0 ^{abc}	0,49 ^a	0,61 ^b	62 ^a	3,02 ^{ab}
	75	40,9 ^a	4,9 ^a	13,1 ^{abc}	0,61 ^a	0,79 ^a	60 ^{ab}	3,11 ^{ab}
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	0,0281	NS	0,0020	0,0010	NS	0,0156
	cuadrática	NS	0,0347	NS	NS	0,0098	NS	0,0298
<i>S.o</i>	25	36,1 ^{abc}	3,7 ^{abc}	13,3 ^{abc}	0,21 ^{bc}	0,24 ^d	54 ^{abc}	2,71 ^b
	50	32,1 ^{bc}	3,3 ^{bc}	11,7 ^{bc}	0,22 ^{bc}	0,23 ^d	48 ^{bc}	2,67 ^b
	75	30,0 ^c	2,8 ^c	11,1 ^c	0,25 ^{bc}	0,24 ^d	44 ^c	2,70 ^b
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	NS	NS	0,0161	NS	NS	NS
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>E.s</i>	25	38,3 ^{ab}	3,7 ^{abc}	14,5 ^{ab}	0,23 ^{bc}	0,25 ^d	57 ^{abc}	2,65 ^b
	50	39,0 ^{ab}	3,6 ^{abc}	14,8 ^a	0,25 ^{bc}	0,28 ^{cd}	58 ^{ab}	2,65 ^b
	75	38,7 ^{ab}	3,6 ^{abc}	14,6 ^{ab}	0,27 ^{bc}	0,30 ^{cd}	57 ^{ab}	2,65 ^b
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	NS	NS	0,0306	0,0413	NS	NS
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>G.j</i>	25	37,5 ^{abc}	3,4 ^{bc}	13,6 ^{abc}	0,21 ^c	0,25 ^d	55 ^{abc}	2,69 ^b
	50	36,7 ^{abc}	3,8 ^{abc}	13,0 ^{abc}	0,20 ^{bc}	0,27 ^{cd}	54 ^{abc}	2,83 ^{ab}
	75	38,0 ^{abc}	3,9 ^{abc}	13,0 ^{abc}	0,22 ^{bc}	0,30 ^{cd}	55 ^{abc}	2,94 ^{ab}
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	0,0232	NS	NS	0,0379	NS	0,0074
	cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>B.n</i>	25	36,8 ^{abc}	3,7 ^{abc}	13,1 ^{abc}	0,19 ^{bc}	0,25 ^d	54 ^{abc}	2,82 ^{ab}
	50	37,7 ^{abc}	3,5 ^{abc}	12,5 ^{abc}	0,19 ^{bc}	0,28 ^{cd}	54 ^{abc}	3,04 ^{ab}
	75	35,6 ^{abc}	2,7 ^c	11,1 ^c	0,18 ^c	0,28 ^{cd}	50 ^{abc}	3,26 ^a
Regresión (<i>p</i> -valor)	Lineal	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,0003
	Cuadrática	NS	0,0297	NS	NS	0,0274	NS	0,0093
<i>A.p</i>		1,5	0,3	0,6	0,03	0,03	2,39	0,10

¹*B.h*: *Brachiaria humidicola*; *S.o*: *Senna occidentalis*; *E.s*: *Enterolobium schomburgkii*; *G. j*: *Galactia jussiaeana*; *B.n*: *Belencita nemorosa*; *A. p*: *Ambrosia peruviana*.

²AGVT: Ácidos grasos volátiles totales.

³A:P: relación acetato:propionato.

⁴Error estándar.

NS: regresión lineal o cuadrática no significativa.

Medias en la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

comparación con la dieta control ($p < 0,05$), sin embargo este parámetro se incrementó lineal y cuadráticamente con la especie *A. peruviana*, siendo la dosificación del 75% la que mostró ser diferente ($p < 0,05$) a lo encontrado con la dieta base (3,26 vs 2,62).

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo, identificar un nivel de inclusión específico de plantas nativas de sabanas inundables sobre una dieta base, que permitiera reducir la producción de metano después de 24 h de fermentación con microorganismos ruminales (**figura 1**). Los resultados demostraron que la producción de metano no se redujo con la mayoría de los tratamientos evaluados, no obstante, la máxima inclusión (75%) de las plantas *S. occidentalis* y *E. schomburgkii* generaron valores inferiores en un 18 y 15% respectivamente, con respecto a la dieta control. A pesar de que estos niveles no fueron estadísticamente diferentes, algunos autores consideran representativas reducciones entre 10 y 15% (Bodas *et al.*, 2008; García-González *et al.*, 2008). Por esta razón, en la discusión a continuación se hará principal énfasis en el efecto general de la alta inclusión de estas dos plantas sobre la producción de metano y demás parámetros fermentativos evaluados.

La inclusión del 75% de la especie herbácea *S. occidentalis*, conocida por su alto contenido de antraquinonas (Lombardo *et al.*, 2009), además de presentar

una tendencia a reducir la producción de metano con respecto a la dieta control, también generó altos incrementos en la MSD y la síntesis de amonio. Por su parte, en el perfil de AGV se observaron incrementos en los niveles de butirato, isobutirato y valerato. Estos resultados coinciden con otros estudios en donde se ha evaluado el efecto de antraquinonas sobre la producción de metano. En compuestos como 9,10 antraquinona, García-Lopez *et al.* (1996) encontraron que en dietas a base de forrajes, la metanogénesis se redujo entre 36-78 %, además, observaron un marcado aumento en la proporción de valerato, isovalerato y butirato. Con este mismo compuesto, Sirohi *et al.* (2011) reportan aumentos en las concentraciones de amonio (>140 mg/L), síntesis de proteína microbiana (61-76 mg) y digestibilidad de MS (65-68%) en dietas altamente fibrosas. A pesar de las similitudes encontradas con los estudios reportados anteriormente, García-Lopez *et al.* (1996) y Ebrahimi *et al.* (2011) también encontraron incrementos en las concentraciones de propionato. Este resultado contrasta con lo observado en el presente estudio, en donde los niveles de este compuesto permanecieron constantes.

La similitud entre los estudios realizados con 9,10 antraquinona y los encontrados con la planta *S. occidentalis*, sugieren que las antraquinonas que se reportan en esta especie (Vashishtha *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2009) pueden estar contribuyendo con la menor producción de metano observado con este nivel de

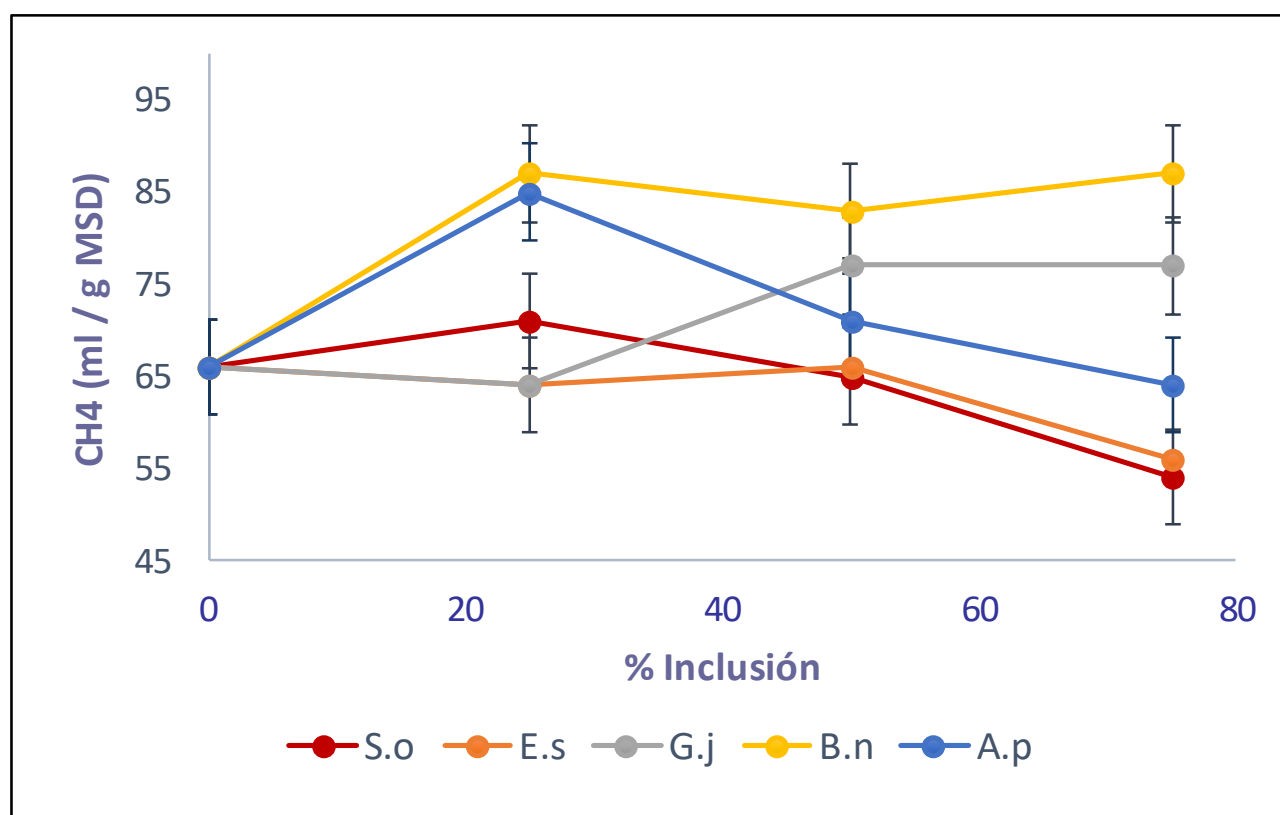


Figura 1. Efecto de la dosificación de las plantas a la dieta base (*B. humidicola*) sobre la producción de metano *in vitro*, después de 24h de fermentación (Effect of the dosification of the plants to the base diet (*B. humidicola*) on the *in vitro* methane production after 24 hours of fermentation).

S.o: *Senna occidentalis*; E.s: *Enterolobium schomburgkii*; G.j: *Galactia jussiaeana*; B.n: *Belencita nemorosa*; A.p: *Ambrosia peruviana*. Las líneas verticales sobre cada punto corresponden al error estándar.

inclusión, no obstante, en las hojas de esta planta, también se han encontrado otros compuestos como flavonoides, alcaloides, taninos, florotaninos, saponinas, entre otros (Yadav *et al.*, 2010) los cuales podrían tener una participación importante a través de interacciones sinérgicas (Bhatta, 2015). Futuras investigaciones se requieran en esta área.

Los altos valores de MSD obtenidos con la planta *S. occidentalis* (56-70%), son similares a los obtenidos por Vélez *et al.* (2015). Este efecto pudo estar determinado por los elevados niveles de amonio resultante de la degradación de la proteína, el cual es utilizado como fuente de nitrógeno por las poblaciones ruminales y por lo tanto es un factor determinante en la síntesis de células microbiales (Bryant y Robinson, 1962), las cuales favorecen una mayor degradación de los componentes fibrosos de la dieta (Van Soest, 1982). La síntesis de células microbiales también se pudo beneficiar por los incrementos en los niveles de isobutirato, un ácido graso de cadena ramificada que surge a partir de la fermentación de los aminoácidos de cadena ramificada y que es requerido para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos ruminales y una adecuada degradación de los componentes estructurales de la dieta (Wang *et al.*, 2015). Varias investigaciones reportan el efecto benéfico del isobutirato en la degradación de la materia seca (Cummins y Papas, 1985), FDN (Yang, 2002) y hasta en reducir las emisiones de metano en novillas (Wang *et al.*, 2015).

Los menores volúmenes de metano observados, y el efecto constante sobre los niveles de propionato, indican que los H_2 provenientes de la degradación del sustrato fueron utilizados por vías alternas, evitando así su acumulación y posterior efecto adverso sobre la fermentación. La mayor proporción de butirato indica que la concentración de H_2 se redujo, ya que durante la formación de este compuesto a partir de 1 mol de glucosa, se liberan menos H_2 comparados con la formación de acetato (Ungerfeld, 2015; Buccioni *et al.*, 2015). De esta manera, los H_2 disponibles fueron usados en la producción de valerato (AGV glucogénico) (Kebreab *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2008) y para una mayor síntesis de biomasa microbiana (Leng y Preston, 2010).

A pesar de los efectos positivos que se observaron con la máxima inclusión de *S. occidentalis* sobre algunos parámetros fermentativos, existe una desventaja y es su manifiesta toxicidad en varias especies animales (Vashishtha *et al.*, 2009). En bovinos se han encontrado casos de intoxicación espontánea con animales en pastoreo (Mussart *et al.*, 2013; Carmo *et al.*, 2011), sin embargo, este efecto se atribuye especialmente al consumo de sus semillas (Rogers *et al.*, 1979; Barros *et al.*, 1990; Barth *et al.*, 1994). A pesar de que aún no se conoce el compuesto tóxico con precisión, al parecer en rumiantes la toxicidad depende de la parte de la planta consumida y la cantidad (Yadav *et al.*, 2010). Para considerar el uso de *S. occidentalis* en la nutrición de bovinos, aun se requieren estudios que permitan identificar el nivel de inclusión adecuado (dosis mínima y letal) que no afecte el desempeño y bienestar de los animales. A su vez, es necesario aislar los compuestos secundarios presentes en esta planta para verificar el potencial antimetanogénico de cada uno de ellos en

experimentos *in vitro* de larga duración y su posterior análisis en experimentos *in vivo*.

Otra especie que redujo la producción de metano con respecto a la planta control fue *E. schomburgkii*, con la dosificación del 75 %. Con este nivel de inclusión también se observó un efecto positivo en la síntesis de amonio, y negativo sobre la MSD y la producción de gas. Evidentemente, estos resultados indican que el principal mecanismo por el cual se encontraron menores valores de metano con esta planta, es porque se afectó la MSD (Bodas *et al.*, 2012; Durmic *et al.*, 2010), sin embargo, no se observaron reducciones en las proporciones de los principales AGV (acetato, butirato y propionato) y tampoco en los AGVT. Efectos similares se han encontrado en las plantas *Biserrula pelecinus* L. y *Eremophila glabra* (Banik *et al.*, 2013; Li, 2013).

En la técnica de producción de gases, los sustratos degradados son convertidos en AGV's, CO_2 , CH_4 , agua y células microbianas (Getachew *et al.*, 1998; Makkar, 2005). La producción de gas refleja cuanto del sustrato degradado se utilizó principalmente para la formación de AGV's (Getachew *et al.*, 1998). A pesar de que la inclusión del 75 % de la especie *E. schomburgkii* disminuyó la MSD y la producción de gas, la fermentación del sustrato se mantuvo en niveles adecuados como para que no se afectara la concentración de los AGVT. La menor producción de gas se puede atribuir a que se redujo la proporción de metano presente en el gas (Banik *et al.*, 2013), lo que sugiere un efecto adverso sobre la metanogénesis. Aparentemente, el efecto de los compuestos secundarios presentes en la especie *E. schomburgkii* afectan negativamente a las poblaciones de microorganismos ruminales en general, siendo este efecto menor en los microorganismos celulolíticos y posiblemente mayor sobre las poblaciones de bacterias metanogénicas. Futuras investigaciones se requieren en esta área.

Una reducción en la degradación de los sustratos es un efecto poco deseable ya que se reduce la disponibilidad de nutrientes para el animal, lo que repercute directamente sobre el desempeño productivo (Bodas *et al.*, 2012). En la especie *E. schomburgkii*, la MSD solo se vio afectada con la dosificación del 75 %. Lo anterior indica, que es posible encontrar niveles de inclusión adecuados entre 50 y 75 % que permitan reducir la producción de metano con el menor impacto sobre la degradación del sustrato.

En general, la inclusión de las plantas evaluadas (*G. jussiaeana*, *S. occidentalis*, *E. schomburgkii*, *A. peruviana* y *B. nemorosa*) al sustrato base de *B. humidicola* mejoraron la calidad de la dieta, especialmente en cuanto al contenido proteico. Las dosificaciones de 50 y 75% de estas especies incrementaron los niveles de amonio ruminal, con valores entre 189 - 282 mg/L cercanos a los recomendados por Leng (1990) para dietas a base de forrajes tropicales de baja digestibilidad, los cuales deben estar por encima de 200 mg/L para una adecuada síntesis de proteína microbiana. Aunque las plantas *G. jussiaeana*, *A. peruviana* y *B. nemorosa* no disminuyeron la producción de metano, tampoco afectaron las concentraciones de acetato, butirato, propionato y AGVT. Algunas de ellas generaron tendencias a incre-

mentar linealmente los niveles de butirato (*B. nemorosa*) y valerato (*B. nemorosa* y *G. jussiaeana*). Los resultados demuestran que estas plantas son útiles como alternativas nutricionales para los sistemas ganaderos, en especial para suplementar el contenido proteico de la dieta, uno de los nutrientes más limitantes para rumiantes bajo condiciones tropicales (Soliva *et al.*, 2008; Leng, 1990). De esta manera se promueve el uso de plantas poco conocidas o subutilizadas en los sistemas productivos ubicados en sabanas inundables (FAO, 2012), en busca de una mayor eficiencia alimenticia, que en últimas conlleva a una menor producción de metano por unidad de producto (carne o leche) (Knapp *et al.*, 2014).

Con las especies *S. occidentalis* y *E. schomburgkii* antes de considerarlas como alternativas nutricionales, se recomienda evaluar el efecto de la alta inclusión de estas plantas sobre el ecosistema ruminal, a través de experimentos de larga duración en sistemas de fermentación continuos (eg. Rusitec) que permitan confirmar la menor producción de metano observada en el presente estudio, la persistencia del efecto y el comportamiento de otros parámetros fermentativos en general a través del tiempo.

CONCLUSIONES

Después del proceso de fermentación, ninguna de las plantas evaluadas y sus respectivas dosificaciones redujo significativamente la producción de metano, no obstante, la inclusión del 75% de las especies *S. occidentalis* y *E. schomburgkii* disminuyó este parámetro en un 18 y 15% respectivamente. La alta inclusión de *S. occidentalis* también generó efectos positivos sobre la MSD y los niveles butirato, isobutirato y valerato, por su parte, *E. schomburgkii* disminuyó la MSD y la producción de gas, sin llegar a afectar la concentración de AGVT. Estos altos niveles de inclusión, podrían ser considerado como los más adecuados para lograr reducciones en la producción de metano, sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con precaución, dado que un alto consumo de la planta *S. occidentalis* puede ser tóxica para los animales, mientras que *E. schomburgkii* puede afectar la digestibilidad de la dieta.

La inclusión entre 50 y 75% de las especies evaluadas (*G. jussiaeana*, *S. occidentalis*, *E. schomburgkii*, *A. peruviana* y *B. nemorosa*), incrementaron las concentraciones de amonio, a niveles óptimos para una adecuada síntesis de proteína ruminal en dietas a base de forrajes tropicales. A excepción de las plantas *S. occidentalis* y *E. schomburgkii* las cuales aún requieren investigaciones más profundas para su uso en la nutrición de rumiantes, las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa* y *A. peruviana* se constituyen en alternativas nutricionales para su uso en sistemas productivos ubicados en condiciones de sabanas inundables.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira - Convocatoria del programa nacional de proyec-

tos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 18th Edition. Sidney Williams. Arlington, VA. USA.
- Banik, B.K.; Durmic, Z.; Erskine, W.; Ghamkhar, K. and Revell, C. 2013. *In vitro* ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia. *Crop Pasture Sci*, 64: 935-942.
- Barros, C.S.L.; Pilati, C.; Andujar, M.B.; Graça, D.L.; Irigoyen, L.F.; Lopes, S.T. e Santos, C.F. 1990. Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leg. Caesalpinioideae) em bovinos. *Pesq Vet Bras*, 10: 47-58.
- Barth, AT.; Kommers, G.D.; Salles, M.S.; Wouters, F. and De Barros, C.S. 1994. Coffee Senna (*Senna occidentalis*) poisoning in cattle in Brazil. *Vet Hum Toxicol*, 36: 541-545.
- Bhatta, R. 2015. Reducing enteric methane emission using plant secondary metabolites. Chapter 17. In: V. Sejian *et al.* (Eds.). Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation. Springer Publishing. India.
- Bodas, R.; López, S.; Fernandez, M.; Garcia-Gonzalez, R.; Rodriguez, A. B.; Wallace, R. J. and Gonzalez, J.S. 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim Feed Sci Technol*, 145: 245-258.
- Bodas, R.; Prieto, N.; García-González, R.; Andrés, S.; Giráldez, F.J. and López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim Feed Sci Technol*, 176:78-93.
- Bryant, M.P. and Robinson, I.M. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *J Bact*, 84: 605-614.
- Broucek, J. 2014. Production of methane emissions from ruminant husbandry: A review. *J Env Prot*, 5: 1482-1493.
- Buccioni, A.; Cappucci, A. and Mele, M. 2015. Methane emission from enteric fermentation: Methanogenesis and fermentation. Chapter 11. In: V. Sejian *et al.* (Eds.). Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation. Springer Publishing. India.
- Carmo, P.M.S.; Irigoyen, L.F.; Lucena, R.B.; Figuera, R.A.; Kommers, G.D. and Claudio S.L. 2011. Spontaneous coffee senna poisoning in cattle: Report on 16 outbreaks. *Pesq Vet Bras*, 31: 139-146.
- Cummins, K. A. and Papas, A. H. 1985. Effect of isocarbon 4 and isocarbon 5 volatile fatty acids on microbial protein synthesis and dry matter digestibility *in vitro*. *J Dairy Sci*, 68: 2588-2595.
- Dijkstra, J.; Oenema, O. and Bannink, A. 2011. Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Curr Opin Env Sust*, 3: 414-422.
- Durmic, Z. and Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim Feed Sci Technol*, 176: 150-162.
- Durmic, Z.; Hutton, P.; Revell, D.K.; Emms, J.; Hughes, S. and Vercoe, P.E. 2010. *In vitro* fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Anim Feed Sci Technol*, 160: 98-109.
- Ebrahimi, S.H.; Mohini, M.; Singhal, K.K.; Miri, V.H. and Tyagi, A.K. 2011. Evaluation of complementary effects of 9,10anthraquinone and fumaric acid on methanogenesis and ruminal fermentation *in vitro*. *Arch Animal Nutr*, 65: 267-277.
- Ellis, J.L.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Bannink, A.; Odongo, N.E.; McBride, B.W. and France, J. 2008. Modelling Animal Systems Paper: Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *J Agr Sci*, 146: 213-233.
- FAO. 2012. Use of lesser-known plants and plant parts as animal feed resources in tropical regions, by E. S. Quansah & Harinder P.S. Makkar. Animal production and health working. Paper. No. 8. Rome.
- García-González, R.; López, S.; Fernández, M.; Bodas, R. and González, J.S. 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing

- ruminal methane production *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol*, 147: 36-52.
- García-López, P.M.; Kung Jr. and Odom, J.M. 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-Anthraquinone. *J Anim Sci*, 74: 2276-2284.
- Getachew, G.; Blümmel, M.; Makkar, H.P. and Becker, K. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol*, 72: 261-281.
- Giubrunca, M.; Criste, A.; Cocan, D.; Constantinescu, R.; Raducu, C. and Miresan, V. 2014. A Review: Methane production in the rumen and its influence on global warming. *J Proenv*, 7: 64-70.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agriculture Handbook*, No. 379. Washington, D.C. USA. pp. 1-20.
- InfoStat. 2013. Software estadístico versión 1613-2013. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Kebreab, E.; Johnson, K.A.; Archibeque, S.L.; Pape, D. and Wirth, T. 2008. Model for estimating enteric methane emissions from United States dairy and feedlot cattle. *J Anim Sci*, 86: 2738-2748.
- Knapp, J. R.; Laur, G. L.; Vadas, P. A.; Weiss, W. P.; Tricarico J. M. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J Dairy Sci*, 97: 3231-3261.
- Leng, R.A. 1990. Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Res Rev*, 3: 277-303.
- Leng, R.A. and Preston, T.R. 2010. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. *Livest Res Rural Dev*, 22, Article #221.
- Li, X. 2013. *Eremophila glabra* reduces methane production in sheep. Doctoral thesis. The University of Western Australia. Chapter 3: 20-29.
- Li, X.; Durmic, Z.; Liu, S.; McSweeney, C.S. and Vercoe, P.E. 2014. *Eremophila glabra* reduces methane production and methanogen populations when fermented in a Rusitec. *J Anaerobe*, 29: 100-107.
- Lombardo, M.; Kiyota, S. e Kaneko, T.M. 2009. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, 30: 9-17.
- López, S.; Dhanoa, M.S.; Dijkstra, J.; Bannink, A.; Kebreab, E. and France, J. 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim Feed Sci Technol*, 135: 139-156.
- Makkar, H.P.S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Anim Feed Sci Technol*, 123-124: 291-302.
- Mussart, N.B.; Koza, G.A.; Lértora, J.; Álvarez Chamale, G.M. y Coppo, J.A. 2013. Intoxicación por *cafetillo* (*Cassia occidentalis*) en bovinos del nordeste argentino. *Rev Vet*, 24: 138-143.
- Patra, A. and Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *J Phytochem*, 71: 1198-1222.
- Peñuela, L.; Fernández, A.; Castro, F. y Ocampo, A. 2011. Uso y manejo de forrajes nativos en la sabana inundable de la Orinoquia. Fundación Horizonte Verde. Universidad de los Llanos. Unillanos. pp. 6-65. <http://www.horizonteverde.org.co/noticias/LIBRO-FORRAJES-NATIVOS-FINAL.pdf> (03/012/2012).
- Posada, S.L. y Noguera, R.R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livest Res Rural Dev*, vol. 17, Art. #36.
- Rodríguez, J.; Valle, A. y De Torres, F. 1997. Frecuencia de selección de gramíneas por bovinos a pastoreo en sabanas mal drenadas. *Zoot Trop*, 15: 91-105.
- Rogers, R.J.; Gibson, J. and Reichman, K.O. 1979. The toxicity of *Cassia occidentalis* for cattle. *Aust Vet J*, 55: 408-412.
- Sirohi, S.K.; Pandey, N.; Mohini, M.; Puniya, A.K.; Singh, B.; Kundu, S.S. and Thube, H. 2011. Effect of monensin and anthraquinone supplementation on rumen fermentation and methane mitigation *in vitro*. *Indian J Anim Sci*, 81: 859-863.
- Soliva, C.R.; Zeleke, A.B.; Clément, C.; Hess, H.D.; Fievez, V. and Kreuzer, M. 2008. *In vitro* screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Anim Feed Sci Technol*, 147: 53-71.
- Ungerfeld, E.M. 2015. Shift in metabolic hydrogen sink in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Front Microbiol*, 6: 1-17.
- Van Soest, P.J. 1982. Fecal composition, mathematics of digestion balances and markers. In: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Inc. OR. pp. 39-57
- Vashishtha, V.M.; John, T.J. and Kumar, A. 2009. Clinical & pathological features of acute toxicity due to *Cassia occidentalis* in vertebrates. *Indian J Med Res*, 130: 23-30.
- Vélez, O.M.; Campos, R. y Sánchez, H. 2015. Propiedades antimetanogénicas *in vitro* de algunas plantas adaptadas a las condiciones de sabana inundable del departamento de Arauca, Colombia. *Trop Subtrop Agroecosyst*, 18: 335-345.
- Wang, C.; Liu, Q.; Zhang, Y.L.; Pei, C.X.; Zhang, S.L.; Wang, Y.X.; Yang, W.Z.; Bai, Y.S. and Liu, X.N. 2015. Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 99: 123-131.
- Yadav, J.P.; Arya, V.; Yadav, S.; Panghal, M.; Kumar, S. and Dhankhar, S. 2010. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *J Fitote*, 81: 223-230.
- Yang, C.M.J. 2002: Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. *J Dairy Sci*, 85: 1183-1190.
- Zeleke, A.B.; Clement, C.; Hess, H.D.; Kreuzer, M. and Soliva, C.R. 2006. Effect of foliage from multi-purpose trees and a leguminous crop residue on *in vitro* methanogenesis and ruminal N use. *Int. Congress Ser*, 1293: 168-171.
- Zmora, P.; Cieślak, A.; Pers-Kamczyc, E.; Szyszka, P. and Szumacher-Strabel, M. 2012. An *in vitro* study on the effect of sage, *Salvia officinalis* L. on rumen fermentation. *J Anim Feed Sci*, 21: 613-623.