



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y  
MANEJO DE RECURSOS  
NATURALES TROPICALES

**EFFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS DE *Samanea saman* SOBRE LA DIGESTIBILIDAD, PATRÓN DE FERMENTACIÓN Y PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO EN NOVILLAS**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**POR:**

**Zootecnista**

**Sara Stephanie Valencia Salazar**

**Directores:**

**PhD. Juan Carlos Ku Vera**

**PhD. Francisco Javier Solorio**

**PhD. Luis Ramírez Avilés**

Mérida, Yucatán., México, septiembre de 2017



POSGRADO INSTITUCIONAL  
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO  
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y  
MANEJO DE RECURSOS  
NATURALES TROPICALES

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

**ALUMNA: ZOOTECNISTA  
SARA STEPHANIE VALENCIA SALAZAR**

**SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO**

**DR. ARTURO CASTELLANOS RUELAS  
FIQ-UADY**

\_\_\_\_\_

**DR. ARMIN AYALA BURGOS  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

**DR. CARLOS AGUILAR PÉREZ  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

**DR. CARLOS SANDOVAL CASTRO  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

**DR. LUIS SARMIENTO FRANCO  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

**MÉRIDA, YUCATÁN, SEPTIEMBRE DEL 2017**

## **DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD**

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

---

Zootecnista Sara Stephanie Valencia Salazar

## **DEDICATORIA**

Le dedico este logro a mi madre Rubiela María Salazar Pérez por creer en mis capacidades y darme siempre el apoyo y la motivación necesaria para lograr mis objetivos.

A mi abuelita Elvia Pérez (†) por sus enseñanzas y hacerme una persona de bien.

A mi padre Efrén Antonio Valencia Cortés por el amor y la comprensión que me brinda de manera incondicional en todo momento.

A mi hermanito José Daniel por hacerme sentir especial y orgullosa de tenerlo en mi vida.

A mi tía Lucila Salazar y Erinson Sánchez por su cariño y apoyo siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme salud física y mental para desarrollar mis actividades.

Al Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán por darme la oportunidad de realizar las actividades académicas necesarias para culminar con los estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

A mi asesor Dr. Juan Carlos Ku Vera por su apoyo y motivación, por guiarme a lo largo de la Maestría y darme las herramientas necesarias para la realización de la tesis.

A mis asesores Dr. Francisco Javier Solorio Sánchez y Dr. Luis Ramírez y Avilés por sus aportes a mi trabajo.

A mis tutores, Dr. Armín Javier Ayala Burgos y Dr. Arturo Castellanos Ruelas por todos los comentarios y sugerencias a mi trabajo.

A todos los que hacen parte del LACCLIGA, amigos y compañeros que estuvieron para apoyarme a lo largo de este proceso.

A Juanito y demás trabajadores de corrales que me apoyaron en el trabajo experimental.

A los Dres. Esteban Hau y Roger Delgado del área de lechería por el préstamo de los animales para la realización de este trabajo.

A mis familiares, tíos y tías que donde quiera que estén siempre me dan su amor y apoyo.

A los que me hicieron sentir en casa y parte de su familia.

A Marco Antonio Torres Castro por motivarme a iniciar esta aventura.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de frutos de *Samanea saman* sobre el consumo de materia seca (CMS), digestibilidad, población protozoaria, parámetros de fermentación y producción de CH<sub>4</sub> entérico en novillas alimentadas con pasto de baja calidad. Se utilizaron cuatro novillas cruzadas (*Bos taurus* × *B. indicus*) con un peso promedio inicial de 236 ± 4.2 kg ( $\mu \pm DS$ ) en un diseño en cuadrado Latino (4 × 4) con cuatro períodos de 23 días (17 días para adaptación al manejo y a la dieta y seis días para mediciones de las variables de respuesta). Los niveles de inclusión en la ración del fruto molido de *S. saman* fueron de 0, 10, 20 y 30% de materia seca (MS). La producción de CH<sub>4</sub> entérico se midió usando dos cámaras de respiración de circuito abierto. La incorporación de los niveles de *S. saman* no tuvo efecto sobre el CMS (P = 0.66), digestibilidad (P = 0.08) y población protozoaria (P = 0.08). Sin embargo, la producción de CH<sub>4</sub> entérico se vio afectada por el nivel de inclusión de *S. saman* (P = 0.035). Adicionalmente, la producción de CH<sub>4</sub> entérico mostró una reducción lineal a medida que a la inclusión de *S. saman* en la dieta incrementó (P = 0.007). Se observó una reducción del 50.9% de CH<sub>4</sub> (L/día) con el nivel de inclusión más alto, comparado con la dieta control (P = 0.009). Las concentraciones de propionato incrementaron linealmente (P = 0.01), mientras que la concentración de acetato y la proporción de acetato: propionato disminuyeron linealmente (P < 0.01) cuando las novillas fueron suplementadas con *S. saman*. Se concluye que la inclusión de la harina de los frutos de *S. saman* en la ración en un 30% tiene la capacidad de reducir las pérdidas de energía bruta consumida en forma de CH<sub>4</sub> entérico hasta en un 47.5% comparado con el tratamiento control.

**Palabras clave:** gases de efecto invernadero, cámaras de respiración, pasto tropical, ácidos grasos volátiles

## SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of dietary inclusion of *S. saman* ground pods on dry matter intake (DMI), digestibility, protozoal population, fermentation parameters and enteric CH<sub>4</sub> production in heifers fed low-quality forage. Four crossbred heifers (*Bos taurus* × *B. indicus*) with an initial average weight of 236 ± 4.2 kg were used in a Latin square design (4×4) with four periods of 23 days (17 days for adaptation and six days for measurements of the response variables). Levels of inclusion of *S. saman* ground pods were 0, 10, 20 and 30% of dry matter (DM). Enteric CH<sub>4</sub> production was measured using two open-circuit respiration chambers. The incorporation of *S. saman* levels had no effect on DMI (P = 0.66), digestibility (P = 0.08) and protozoa population (P = 0.08). However, enteric CH<sub>4</sub> production was affected by the increasing levels of *S. saman* (P = 0.035). In addition, the production of enteric CH<sub>4</sub> showed a linear reduction as the inclusion of *S. saman* in the diet increased (P = 0.007). A reduction of 50.9% of CH<sub>4</sub> (L / day) was observed with the highest inclusion level compared to the control diet (P = 0.009). Propionate concentrations increased linearly (P = 0.01), while acetate concentration and acetate: propionate ratio decreased linearly (P <0.01) when heifers were supplemented with *S. saman*. It is concluded that the inclusion of *S. saman* pod meal in 30% of the ration has the capacity to reduce gross energy intake losses in the form of enteric CH<sub>4</sub> up to 47.5% compared to the control diet.

**Keywords:** greenhouse gas, respiration chambers, tropical grass, volatile fatty acids

## INDICE GENERAL

	Contenido	Página
	<b>Capítulo I</b>	
1.	Introducción	1
	<b>Capítulo II</b>	
2.	Revisión de literatura	2
2.1.	Gases de efecto invernadero y calentamiento global	2
2.2.	Emisiones de metano entérico	3
2.3.	Metanogénesis ruminal	4
2.4.	Uso de metabolitos secundarios como alternativa para mitigar las emisiones de metano entérico en el trópico	7
2.5.	<i>Samanea saman</i> : generalidades	11
	2.5.1. <i>Samanea saman</i> en la alimentación de rumiantes	13
	2.5.2. Potencial de <i>Samanea saman</i> en la reducción de las emisiones de metano entérico	14
2.6.	Cámaras de respiración de circuito abierto	15
2.7.	Referencias	17
	<b>Capítulo III</b>	
3.	Hipótesis y objetivos	24
	<b>Capítulo VI</b>	
4.	Artículo científico: Potential of <i>Samanea saman</i> pod meal for methane mitigation in crossbred heifers in the tropics	25
	Referencias	41



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición química de los frutos de <i>S. saman</i> (%MS)	13
<b>Table 1.</b> Chemical composition (g/kg DM) of the experimental diets	30
<b>Table 2.</b> Proportion of ingredients in the experimental diets and chemical composition of experimental diets	30
<b>Table 3.</b> Intake and digestibility in heifers fed <i>Penisetum</i> . and increasing levels of <i>S. saman</i>	34
<b>Table 4.</b> VFA molar proportions in the rumen of heifers fed <i>P. purpureum</i> and increasing levels of <i>S. saman</i>	35
<b>Table 5.</b> Rumen DM degradation (%) of different components of <i>S. saman</i> pods	35
<b>Table 6.</b> Enteric CH <sub>4</sub> production in heifers fed <i>P. purpureum</i> and increasing levels of <i>S. saman</i>	36
<b>Table 7.</b> Protozoa population in heifers fed <i>P. purpureum</i> and increasing levels of <i>S. saman</i>	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Cuotas de emisiones de GEI de los sectores económicos 2010	3
<b>Figura 2.</b> Resumen de estrategias de mitigación de metano entérico en el trópico (tomado y modificado de Eckard et al. 2010)	7
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de acción de los taninos y las saponinas sobre la formación del metano y la productividad (diagrama propio, diseñado a través de revisión de literatura)	11
<b>Figura 4.</b> Cámara de respiración de circuito abierto, sección lateral	16

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una creciente preocupación a nivel mundial con respecto al calentamiento global, consecuencia de la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera emitidos por las actividades antropogénicas. Una de las principales actividades que emite grandes cantidades de GEI, en especial gas metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), es la ganadería bovina. El CH<sub>4</sub> es un subproducto de la fermentación de los carbohidratos en el rumen y constituye una pérdida de la energía total consumida por el animal, lo cual establece una ineficiencia productiva y adicionalmente contaminación ambiental. Es uno de los gases con mayor potencial de efecto invernadero, siendo 23 veces mayor que el CO<sub>2</sub> y una vida media de 10 años en la atmósfera (Solomon *et al.*, 2007). El CH<sub>4</sub> entérico constituye el 39.1% de las emisiones de GEI provenientes del sector ganadero (Gerber *et al.*, 2013), por lo que es importante establecer alternativas que disminuyan sus emisiones.

Una de las alternativas aplicadas en rumiantes para mitigar las emisiones de CH<sub>4</sub>, es la implementación de dietas que contengan metabolitos secundarios. Diversos autores han reportado que el uso de compuestos como las saponinas, los taninos condensados y aceites esenciales reducen la producción de CH<sub>4</sub> a nivel ruminal (Goel *et al.*, 2008; Knapp *et al.*, 2014; Harrison *et al.*, 2015). Sin embargo, la efectividad de los metabolitos secundarios varía dependiendo de la fuente, el tipo y nivel de la sustancia activa responsable del efecto sobre los protozoarios y metanógenos (Salem *et al.*, 2012). Recientemente se han realizado investigaciones encaminadas al uso de recursos forrajeros tropicales, tales como árboles y arbustos, los cuales además de su potencial en la alimentación de los rumiantes, poseen una amplia variedad de metabolitos secundarios (Delgado, 2014). La especie *Samanea saman* (Jacq.) Merr. constituye una alternativa como suplemento alimenticio por su producción de frutos en épocas secas (Delgado, 2014) y su alta calidad nutritiva, adicionalmente contiene metabolitos secundarios (taninos condensados y saponinas) con potencial antimetanogénico.

La mitigación de las emisiones de CH<sub>4</sub> es un punto de partida para el desarrollo de nuevas tecnologías encaminadas a mejorar la eficiencia productiva y reducir el impacto ambiental de la ganadería en el trópico.

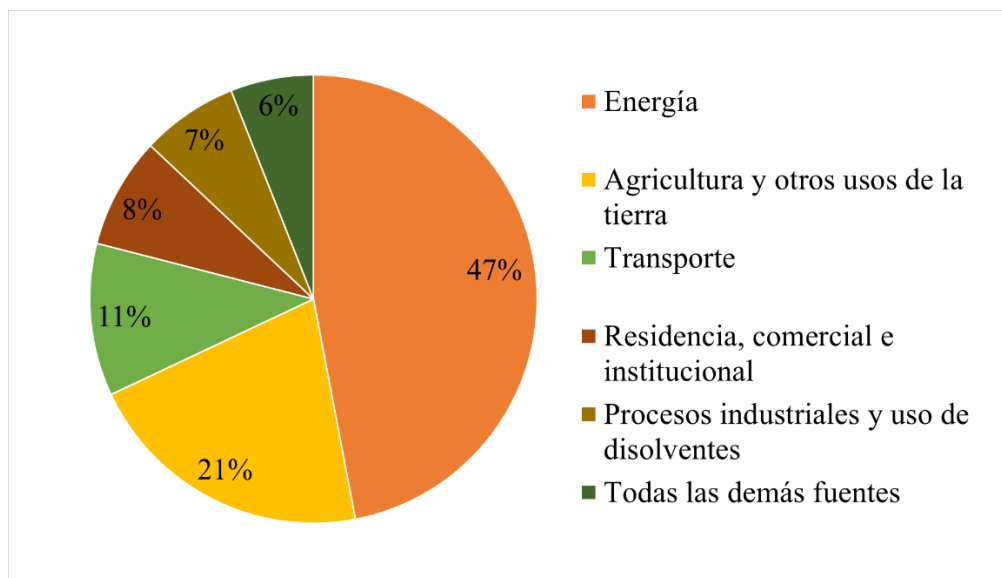
## **CAPÍTULO II**

### **2. REVISION DE LITERATURA**

#### **2.1. Gases de efecto invernadero y calentamiento global**

Las actividades económicas realizadas por el ser humano emiten grandes cantidades de gases de efecto invernadero (GEI) a la atmósfera, los cuales, al ser retenidos ocasionan cambios en el medio ambiente que repercuten en la salud y calidad de vida de los seres que habitamos el planeta. Los principales GEI son el CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O y sus concentraciones globales atmosféricas han aumentado drásticamente como resultado de las actividades humanas desde 1750 (IPCC, 2007), debido al inicio de la revolución industrial. Estos gases tienen la capacidad de absorber calor y emitir radiación a lo cual se le conoce como efecto invernadero. Moss et al. (2000) indican que el 30% de la radiación solar emitida por el sol es absorbida por los GEI que se encuentran en la atmósfera aumentando con ello el calor de la tierra. Un exceso en las concentraciones de estos gases provoca un calentamiento de la superficie terrestre por encima de lo normal (Primavesi, 2004). Los incrementos globales en la concentración CO<sub>2</sub> en los últimos años se deben principalmente al uso de combustibles fósiles y el cambio de uso del suelo, mientras que las de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O se deben principalmente a las actividades agropecuarias (IPCC, 2007). El CO<sub>2</sub> se encuentra en mayor proporción en la atmósfera y es el que tiene un mayor aporte al incremento del calentamiento global (Carmona, 2005). Las tasas de acumulación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en la atmósfera han cambiado drásticamente en los últimos años presentando un incremento de forma exponencial (Preston, 1989). El IPCC (2007) menciona que la temperatura en la tierra aumentó 0.65±02 grados centígrados en el periodo de 1905 a 2005 de la misma manera se estima que si las emisiones de GEI siguen en aumento la temperatura de la tierra para el 2035 aumentará 2°C.

**Figura 1.** Cuotas de emisiones de GEI de los sectores económicos 2010



Fuente: FAO, 2016

El sector agrícola contribuye con el 22% del total de las emisiones de gases de efecto invernadero globales, de las cuales casi el 80% provienen de la ganadería incluyendo los procesos de transporte y producción de alimento para el ganado (McMichael et al., 2007). El CH<sub>4</sub>, el N<sub>2</sub>O y el CO<sub>2</sub> constituyen los principales gases de efecto invernadero emitidos por el sector ganadero. La producción de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O, está altamente asociada a la ganadería en mayor proporción que el CO<sub>2</sub> y son potentes GEI con capacidades de calentamiento 23 y 310 veces más que el CO<sub>2</sub>, respectivamente.

## 2.2. Emisiones de metano entérico

El CH<sub>4</sub> en los últimos 10 años ha sido considerado uno de los GEI más importantes. La producción anual de CH<sub>4</sub> es de 80 Tg (Foster et al., 2007) encontrándose en una concentración atmosférica del 23% siendo el 70 y 7% restante CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O, respectivamente (Mckenzie, 2003). El incremento acelerado e incontrolado de la industria y las actividades agropecuarias genera cambios en las concentraciones de estos gases en la atmósfera. El CH<sub>4</sub> proveniente de la ganadería es principalmente generado por el aumento en el número de animales, la calidad de las dietas con las cuales son alimentados y el manejo de las heces. El metano entérico contribuye con el 39.1% de las emisiones de GEI provenientes del sector agrícola (Gerber, et al., 2013). Diversos autores

mencionan que los sistemas de pastoreo extensivo en las regiones tropicales generan mayores emisiones de CH<sub>4</sub> comparado con los sistemas intensivos, sin embargo, los sistemas intensivos contribuyen en mayor medida a las emisiones de GEI debido al tipo de manejo del estiércol, dietas altas en energía y proteína, producción y transporte de alimento para el ganado, entre otros factores. La ineficiencia productiva y ambiental de los sistemas extensivos sugieren realizar cambios enfocados a mejorar la eficiencia productiva con menor impacto sobre el medio ambiente.

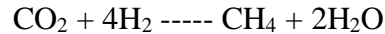
Calcular los inventarios de CH<sub>4</sub> y buscar formas de mitigar las emisiones de GEI es uno de los retos a los que se enfrentan los diferentes países alrededor del mundo. Con la finalidad de cumplir debidamente con los acuerdos internacionales, tales como los protocolos de Montreal (1987) y de Kyoto (1997) y las recientes cumbres de Copenhague (2009) y Cancún (2010) y el acuerdo de París (2015), algunos países se han dado a la tarea de determinar anualmente la tasa de emisiones de CH<sub>4</sub> en rumiantes, otros países tropicales como Brasil, Colombia y Chile están realizando acciones encaminadas a la mitigación de las emisiones de GEI. En este contexto, México se ha comprometido a reducir las emisiones de GEI en 20 % para el 2020 y 50% para el 2050 (DOF, 2012). La organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO, 2011) estima que para el 2050 la población mundial será de 9 mil millones, por ende, la demanda de proteína animal seguirá en aumento. Disminuir los inventarios ganaderos no sugiere una alternativa viable para la mitigación de las emisiones de CH<sub>4</sub> provenientes de la ganadería, por lo que las investigaciones deben estar encaminadas a la implementación de sistemas con alternativas que intervengan en el proceso de metanogénesis ruminal y enfocadas al aprovechamiento sustentable de los recursos naturales o bien incrementar la eficiencia productiva de los sistemas de producción.

### **2.3. Metanogénesis ruminal**

El CH<sub>4</sub> emitido por los rumiantes es un subproducto de la fermentación de los carbohidratos en el rumen (Johnson y Johnson 1995; Van Nevel y Demeyer 1996; Crutzen et al., 1986) y su cantidad varía de acuerdo a las características físico-químicas de la dieta como: la calidad de la dieta, la digestibilidad y la tasa de pasaje (Pinares-Patiño et al., 2012; Molina, 2013), éstas influyen en el

nivel de consumo y la frecuencia de alimentación (Blaxter y Clapperton, 1965; Ulyatt, 2001). En el rumen, los carbohidratos estructurales son fermentados por las bacterias, protozoarios y hongos (Irmgard, 1996). Los productos de la fermentación ruminal son los ácidos grasos volátiles (AGV's) que constituyen una fuente de energía para el rumiante. Otros subproductos como el CO<sub>2</sub> e hidrógeno metabólico (H<sub>2</sub>) sirven como sustrato para los microorganismos metanogénicos principalmente las *Archaeas* (Ramírez, 2014) presentes en el rumen. Estos microorganismos producen CH<sub>4</sub> como estrategia metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento (Schäfer, 1999). Los metanógenos ruminales utilizan principalmente el H<sub>2</sub> resultante de la fermentación de los carbohidratos digestibles para reducir el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> en una serie de reacciones acopladas a la síntesis de ATP, donde el CO<sub>2</sub> es utilizado como fuente de carbono y el H<sub>2</sub> como el principal donador de electrones (Ramírez, 2014). En este proceso 4 moles de H<sub>2</sub> se utilizan para producir un mol de CH<sub>4</sub> (Czerkawski, 1986). La reducción del CO<sub>2</sub> y la conversión del formato intermedio a CH<sub>4</sub> son las fuentes únicas de energía para el crecimiento de bacterias metanogénicas.

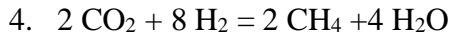
Formación del metano a través de CO<sub>2</sub>:



Debido a la transferencia del hidrógeno los productos finales del metabolismo del rumen son casi exclusivamente H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, ácidos grasos volátiles (AGV's) de cadena corta y acetato, propionato y butirato (Orskov, 1968; Wolin, 1960). El ácido acético representa normalmente entre 60 y el 70%, el ácido propiónico 15-20% y el ácido butírico 10 al 15% de los AGV's producidos en el rumen (Orskov et al., 1968). La variación en las proporciones molares de los AGV's depende de la dieta del animal.

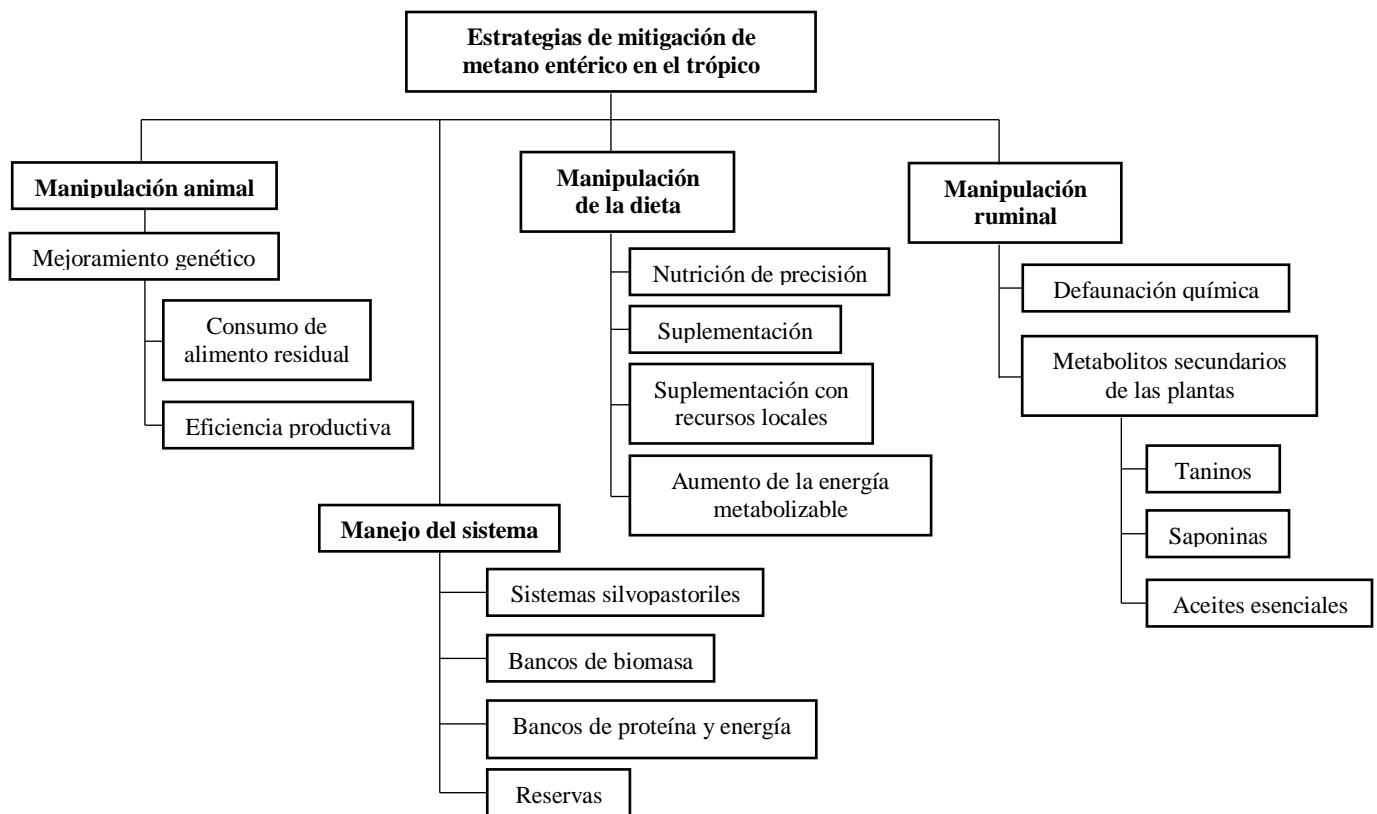
Productos de la fermentación de carbohidratos y formación de AGV's y CH<sub>4</sub>:





La disminución de la síntesis de  $\text{CH}_4$  se lograría inhibiendo las reacciones liberadoras de  $\text{H}_2$  o promoviendo rutas alternativas en las que se elimine  $\text{H}_2$  durante la fermentación. El  $\text{CH}_4$  producido por el rumiante es emitido hacia la atmósfera por medio del eructo. Durante la fermentación ruminal, se estima que se producen aproximadamente de 12 a 16 litros por hora de  $\text{CH}_4$  en un animal de 400 kg (Kurihara et al., 1999). Una vaca adulta puede llegar a producir alrededor de 560 L/ $\text{CH}_4$ /día, un ovino 50 L/ $\text{CH}_4$ /día y una cabra 16.4 L/ $\text{CH}_4$ /día (Ekcard et al., 2010). Se estima que la pérdida de energía en forma de  $\text{CH}_4$  en dietas tropicales está entre el 2 y el 18% de la energía total consumida (Johnson y Ward, 1996) y entre el 11 y el 13% de la energía digestible (McDonald, 2010). Cuantificar y buscar alternativas para mitigar las emisiones de metano provenientes de los rumiantes es de gran importancia en los sistemas de producción tropicales donde las pérdidas de energía en forma de  $\text{CH}_4$  son mayores debido a la baja calidad de las dietas y teniendo en cuenta el costo que representa la alimentación en los sistemas productivos. Diversos autores mencionan que si se lograra reducir la pérdida de energía en forma de  $\text{CH}_4$  se tendría una mayor eficiencia energética (Puchala et al., 2012; Pinares-Patiño et al., 2012; Gerber et al., 2013) debido a un incremento en el consumo de energía metabolizable (EM) consecuentemente en una mejor ganancia de peso y mayor producción de leche, tal como lo demostraron Min *et al.* (2006) al reducir las emisiones de metano entérico en un 30%, observaron que la ganancia de peso fue 20% mayor. Una reducción de un 25% en las emisiones de metano en los rumiantes, acompañado de otros factores nutricionales resultan en un incremento de hasta 1 L de leche al día y de 75 g de peso por día en bovinos (Waghorn *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2006; Beauchemin *et al.*, 2009;). En la figura 2 se observan estrategias de mitigación de metano entérico en los sistemas de producción tropicales.





**Figura 2.** Resumen de estrategias de mitigación de metano entérico en el trópico (tomado y modificado de Eckard et al., 2010)

## 2.4. Uso de metabolitos secundarios como alternativa para mitigar las emisiones de metano entérico en el trópico

En la búsqueda de alternativas para la mitigación de las emisiones de metano entérico se han encontrado diversas estrategias con diferentes resultados. Algunas de ellas son: el uso de antibióticos, modificación de la fermentación ruminal, modificación de las dietas, entre otras. Sin embargo, algunas de estas estrategias suelen tener altos costos y restringen la venta de derivados lácteos y cárnicos por la presencia de residuos en el caso del uso de antibióticos o defaunadores químicos. En los sistemas tropicales debido a la baja rentabilidad por la ineficiencia de los sistemas, se requiere de alternativas económicas y viables que mejoren el sistema tanto productiva como ambientalmente. En el trópico, los árboles y arbustos forrajeros son una fuente de nutrientes, que aporta alimento de buena calidad la mayor parte del año, mejora la dieta del animal y reduce

la dependencia de concentrados en las explotaciones pecuarias (Ortega, 2012). Dentro de las estrategias económicas y viables que pueden ser implementadas está el uso de los metabolitos secundarios contenidos en plantas como los taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y alcaloides, entre otros. Los metabolitos secundarios abundan en una gran variedad de árboles y arbustos en regiones tropicales, los cuales pueden provocar una defaunación selectiva en el rumen. Los metabolitos secundarios son sustancias químicas producidas por las plantas como medio de protección contra patógenos y herbívoros. Estos generan una baja palatabilidad por su efecto de astringencia y en altas cantidades llegan a ser tóxicos. Los metabolitos secundarios pueden llegar a afectar los procesos metabólicos del animal y/o la tasa de crecimiento de algunos microorganismos después de su ingestión (Durmic y Blache, 2012). Sin embargo, son importantes en la interacción de la planta con su entorno, al atraer organismos que polinizan y dispersan las semillas (Marienhagen y Bott, 2013).

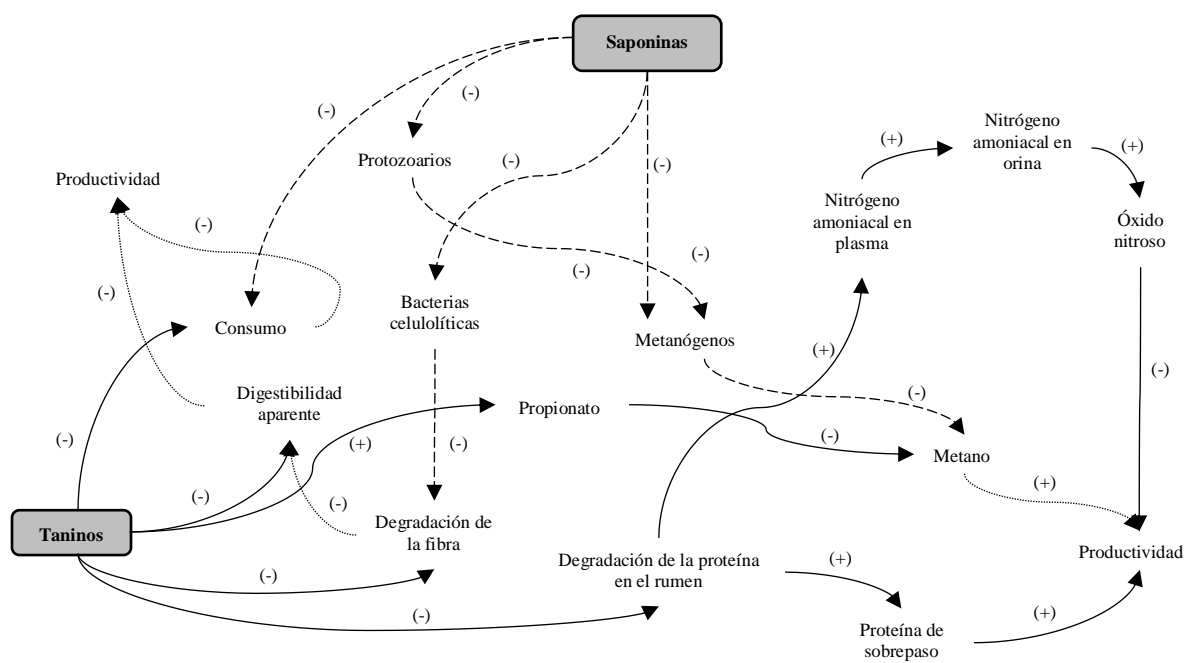
El método de defaunación a través del uso de metabolitos secundarios como los taninos condensados (TC) y las saponinas pueden provocar una disminución de la población protozoaria y bacteriana a través de mecanismo de acción directa sobre las membranas celulares causando lisis y muerte (Francis et al. 2002; Mao et al., 2010). Consecuentemente se genera una disminución en la degradación de los alimentos en el rumen, cambio en los perfiles de los AGV's y una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> (Hu et al., 2005; Soliva et al., 2008; Mao et al., 2010; Patra y Saxena, 2010). El efecto de los metabolitos secundarios de las plantas sobre los microorganismos presentes en el rumen y la digestibilidad de los alimentos consumidos generan cambios en los productos finales de la fermentación. Estos efectos incluyen cambios en los patrones de fermentación (proporción acético: propiónico), cantidad total de AGVs producidos y reducción en la cantidad de nitrógeno amoniacal producido en el rumen. Una reducción en la cantidad de nitrógeno amoniacal en el rumen, mejora la asimilación del nitrógeno por parte del animal (Patra y Saxena, 2009). El incremento en la proporción de ácido propiónico en el líquido ruminal podría reducir la producción de metano debido a la disminución en la síntesis de H<sub>2</sub> y consecuentemente la disponibilidad de esto para las bacterias y protozoarios. El efecto que los metabolitos secundarios de las plantas ejercen sobre la metanogénesis varía dependiendo de la fuente, tipo, la cantidad del metabolito, su peso molecular y el animal. Dentro de los metabolitos secundarios más

usados para disminuir las emisiones de metano están los taninos condensados y las saponinas (Min et al., 2006; Patra y Saxena, 2010; Puchala et al., 2012; Piñeiro-Vázquez et al., 2017).

Los taninos son compuestos polifenólicos producto del metabolismo de las plantas y se clasifican en hidrolizables y condensados (Ortiz, 2014). Los taninos hidrolizables son ésteres por ácidos, bases y enzimas y están formados por una molécula de azúcar (generalmente glucosa) unida a un número variable de ácidos fenólicos, ácido gálico y elágico, agrupándose así en galotaninos y elagitaninos (Barbehenn y Constabel, 2011). Los taninos condensados (TC) no son hidrolizables por ácidos ni enzimas y son conocidos como poliflavonoides o proantocianidinas, ya que están constituidos por flavonoides con diferente grado de condensación, además de carbohidratos y trazas de aminoácidos (Peña, 2007). Los TC son compuestos polifenólicos de alto peso molecular (Kamra et al., 2006) que tienen la capacidad de formar complejos con macromoléculas, especialmente con polisacáridos y proteínas generando una disminución en su degradación ruminal (Waghorn, 2008, Naumann et al., 2013). Los TC, al formar complejos con las proteínas disminuyen su degradabilidad en el rumen permitiendo un mayor flujo de proteína de sobrepaso al intestino delgado (Soltan et al., 2012). Los TC tienen la capacidad de reducir la actividad protozoaria (Galindo et al. 2008; Animut et al., 2008; Puchala et al., 2012) y bacteriana de las *Archaea* (Tavendale et al., 2005; Min et al., 2014) mediante la inhibición de la actividad enzimática, disminución en la degradación de los sustratos y acción directa sobre la membrana celular (McSweeney et al., 2001). El efecto secundario de los TC sobre el CH<sub>4</sub> es debido a la reducción en la digestión y fermentación de la fibra, a la disminución en la transferencia inter-específica de hidrógenos entre los protozoarios y las bacterias metanogénicas y al consecuente aumento en la concentración de ácido propiónico en el rumen (Vargas et al. 2012). Se ha reportado una mayor disminución en la producción de metano entérico cuando se incluyen TC frente a los taninos hidrolizables y cuando la concentración en la dieta varía entre 2 y 4% de la MS (Vargas et al. 2012).

Las saponinas son glucósidos de alto peso molecular, se componen de un sacárido (hidrófilo) que puede estar unido a una porción aglicona triterpénica (saponinas triterpénicas) o esteroidal (saponinas esteroidales) (Patra y Saxena, 2009). Las saponinas poseen un característico sabor

amargo y son sustancias solubles en agua, capaces de formar espuma (Oleszek, 2002; Vincken et al., 2007). En las saponinas esteroidales la aglicona contiene 27 átomos de carbono y están presentes en plantas angiospermas de la familia Liliopsida. Las saponinas triterpenoides están compuestas por un núcleo de 30 átomos de carbono y comúnmente se encuentran en plantas angiospermas de la familia Magnoliopsida, sin embargo, en algunos casos ambos tipos de saponinas pueden encontrarse en una misma planta (Sparg et al., 2004; Pen et al., 2006; Podolak et al., 2010). El modo de acción de las saponinas sobre las bacterias se debe a la acción lipofílica sobre la membrana celular aumentando su permeabilidad, y provocando un desequilibrio de la bomba de sodio y potasio, consecuentemente la lisis y muerte de las mismas. El efecto de las saponinas sobre los protozoarios es similar al efecto en las bacterias metanogénicas (Makkar et al., 1998). La mayoría de las saponinas presentan actividad sobre los protozoarios, sin embargo, la disminución en la población de estos microorganismos del rumen conlleva a una serie de ventajas tales como: el establecimiento de una mayor masa microbiana, la mejora en el flujo de proteína microbiana al duodeno, el aumento de la eficiencia de utilización de la energía y la disminución de la producción de GEI como CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Makkar et al., 1998). La metanogénesis ruminal está asociada en un 26% a los protozoarios ciliados (Yañez-Ruiz, 2007), por ende, se espera que al reducir la población protozoaria la producción de CH<sub>4</sub> disminuya. Igualmente, el efecto de las saponinas sobre la metanogénesis ruminal depende del tipo de saponina, el nivel que se incluya en la dieta y su peso molecular. En la Figura 3 se resumen los diferentes mecanismos de acción generados por los taninos y las saponinas y su efecto sobre la productividad y la formación de metano en el rumen.



**Figura 3.** Mecanismos de acción de los taninos condensados y las saponinas sobre la formación del metano y la productividad (diagrama propio, diseñado a través de revisión de literatura)

## 2.5. *Samanea saman*: generalidades

El uso de recursos forrajeros locales y la conservación de los mismos constituye una alternativa para mejorar la productividad y rentabilidad de los sistemas tanto económica como ambientalmente, aumentando el secuestro de carbono, fijación de nitrógeno en el suelo, conservación de cuerpos de agua y biodiversidad y son una fuente de energía y proteína para los animales del sistema. Los frutos y follajes de árboles representan una alternativa disponible de azúcares, carbohidratos, minerales y proteínas para la suplementación del ganado como estrategia para disminuir la dependencia de concentrados comerciales dentro de los sistemas de producción (Palma y Román, 2003). Igualmente, constituyen una fuente de metabolitos secundarios con capacidad de modificar la fermentación ruminal y consecuentemente las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico.

El *S. samán* es un árbol, de gran tamaño, nativo del trópico americano y su cultivo se ha extendido desde el sur de México, por toda la América Central hacia Colombia y Venezuela (Delgado, 2014).

Algunos de sus nombres comunes en Latinoamérica son: Algarrobo, campano, árbol de lluvia, cenícero, samán, tamarindo. En países de habla inglesa se le conoce como Rain tree. Es cultivado en los trópicos como un árbol de sombra y se le ha encontrado en Myanmar (Burma), Sri-Lanka, la India, Jamaica, Nigeria, Sabah, Trinidad, Uganda y la isla de Zanzíbar (Tamashiro, 1976). La especie se ha naturalizado en la mayoría de estos países a la vez que en las Filipinas y Fiji (Rock, 1920). Ha sido ampliamente utilizado en zonas urbanas como árbol ornamental en parques y avenidas, como árbol maderable e igualmente como sombra y fuente de alimento para animales en sistemas de pastoreo.

El *S. saman* es un árbol grande de corteza rugosa que en su hábitat natural puede llegar a alcanzar entre 10 y 25 metros de altura (Delgado, 2014). La copa es amplia y simétrica soportada por ramas horizontales que se extienden ampliamente en forma de sombrilla. Tiene hojas compuestas, alternas, bipinadas con un raquis piloso. Durante los tiempos de sequía, los árboles son semi-decíduos, y pierden sus hojas. Las hojas son ligeramente sensibles a la luz y se cierran por la noche (Staples y Elevitch 2006). El *S. saman* florece entre enero y mayo, con variaciones que dependen de la geografía del lugar donde crece. Las flores son de color rosa claro, dispuestas en umbelas. Se reúnen en inflorescencias vistosas, situadas al final de las ramas (Delgado, 2014). Los frutos son legumbres o vainas, rectas o ligeramente curvas, verdes y carnosas antes de madurar, y oscuras, color marrón, una vez que maduran. Contienen una pulpa seca, oscura y dulce que rodea de 5 a 10 semillas. La maduración de la fruta se produce de febrero a mayo. Las semillas son engrosadas, oblongas, elipsoidales, ligeramente achatadas por los lados, de color marrón (Delgado, 2014). El *S. saman* crece en suelos ligeros, medios y pesados, y también se adapta a condiciones alcalinas y ácidas. Puede tolerar encharcamientos por cortos períodos, pero es intolerante a la sombra y al frío. Requiere riego cuando es joven, y es más resistente a la sequía cuando llega a la adultez. Su forma más común de propagación es por semillas, pero también se reproduce por esquejes y raíces (Selvam 2007).

El *S. saman* tiene un gran potencial como fuente de alimento para rumiantes, especialmente en época de sequía en el trópico donde los nutrientes en los pastos son escasos para el mantenimiento y producción de los animales. Igualmente, constituye un recurso nativo que contribuye a disminuir

el impacto ambiental de la ganadería por su capacidad de fijar nitrógeno al suelo y secuestrar carbono.

### 2.5.1 *Samanea saman* en la alimentación de rumiantes

El fruto de *S. saman* ha sido utilizado en diversos ensayos como suplemento alimenticio por su gran calidad nutricional que le aporta al animal los nutrientes necesarios para cubrir sus requerimientos. En la Tabla 1 se observa la composición química de los frutos completos de *S. saman* reportados por diversos autores.

**Tabla 1.** Composición química de los frutos de *Samanea saman* (%MS)

MS	PB	FDN	FDA	L	TC	SAP	Autores
90.5	14.9	30.4	23.1	-	1.21	1.57	Valencia et al. ( <i>enviado</i> )
92.6	14.2	28.1	23	-	8.4	14.3	Anantasook et al. (2013)
85.4	16.6	33.8	25.9	4.7	-	-	Beltrán (2012)
78	16.97	27.05	18.98	-	-	-	Sackey (2010)
60.5	24.5	53	42	20	-	-	Babayemi et al. (2010)
-	10.7	29.1	-	-	6.1	1.7	Hess et al. (2003)
-	14	31.5	23.7	7.9	-	-	Cecconello et al. (2003)

MS: materia seca, PB: proteína bruta, FDN: fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente ácida, L: lignina, TC: taninos condensados, SAP: saponinas

Una de las ventajas principales de la suplementación con frutos molidos de *S. saman* es el incremento del consumo de materia seca y de energía digestible (Delgado, 2014). Se han realizado diversos estudios donde se evalúa el uso del *S. saman* como fuente de forraje y frutos para rumiantes. En Nicaragua se diseñó un estudio basado en la preferencia de leñosas combinadas en pares, usando la prueba de cafetería. Se utilizó como estimadores, el consumo, tiempo de consumo, número y tamaño de bocados en bovinos. Se utilizaron 10 especies leñosas con potencial forrajero, las cuales fueron: *Acacia farnesiana*, *Albizia niopoides*, *Brosimum alicastrum*, *Cordia dentata*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pigra*, *Moringa oleifera* y *Samanea saman*. En este estudio se encontró que los bovinos tienen preferencia hacia especies leñosas con hojas grandes, como es el caso de *S. saman*, *L. leucocephala*, *M. oleifera* y *A. niopoides* las cuales en forma individual y combinadas, mostraron los mayores consumos, tiempos de

consumo y tamaño de bocado (Pérez, 2012). Rayos et al. (2003) compararon la producción de leche y el contenido de sólidos en la leche de cabras alimentadas con hojas de *S. saman* y *G. sepium* en un 50% de la materia seca ofrecida, respectivamente. Las cabras que fueron suplementadas con *S. saman* tuvieron mayor producción de leche y contenido de sólidos totales comparadas con las que fueron suplementadas con *G. sepium* (Rayos et al., 2003). Hess et al. (2003) encontraron un aumento entre 7 y 10% en la digestibilidad aparente de la materia orgánica cuando los frutos de *S. saman* y *E. cyclocarpum* fueron incluidos en la dieta. Anantasook et al. (2014) encontraron un incremento en las concentraciones totales de AGV's y propionato, así como una disminución en el acetato en novillos suplementados con frutos de *S. saman* (60 g/kg MS). Igualmente, algunos estudios *in vivo* han demostrado que los frutos de *S. saman* pueden ser utilizados como suplemento proteico y energético en sistemas de producción animal en el trópico, debido a que son altamente digestibles y contienen altos contenidos de azúcar y proteína (16-30%) (Jetana *et al.*, 2007; 2008).

### **2.5.2. Potencial de *Samanea saman* en la reducción de las emisiones de metano entérico**

Los frutos del *S. saman* contienen tanto taninos condensados como saponinas triterpénicas (Delgado, 2014), los cuales modifican la fermentación ruminal y consecuentemente la formación de CH<sub>4</sub> entérico. Anantasook y Wanapat (2013) con una inclusión de 60 g/kg de la MS de *S. saman* en la dieta de novillas obtuvieron disminución en los protozoarios y bacterias metanogénicas. En un estudio *in vitro* realizado por Galindo et al. (2012) se concluyó que el *S. saman* reduce la población de metanógenos y ejerce efectos benéficos sobre la ecología microbiana ruminal, al modificar las poblaciones de protozoos, bacterias y hongos celulolíticos. Una reducción en las emisiones de CH<sub>4</sub> de novillos lecheros fue observada por Anantasook et al. (2014) cuando los frutos de *S. saman* fueron suplementadas a 60 g/ kg de MS en proporciones de pasto y concentrado 60:40 y 40:60, con reducciones del 8.25% y 9.25% respectivamente. Hess et al. (2003) no encontraron diferencia en la producción de CH<sub>4</sub> con dietas que incluían frutos molidos de *S. saman* comparado con el control. Galindo et al. (2014) destacó el follaje de *S. saman* entre las plantas tropicales más prometedoras para reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico de acuerdo a los resultados encontrados al comprar follajes de diferentes plantas tropicales en un estudio *in vitro*.



## **2.6. Cámaras de respiración de circuito abierto para la medición de las emisiones de metano en rumiantes**

Existen diversas técnicas utilizadas para la cuantificación de la producción de CH<sub>4</sub> entérico, algunas de ellas *in vitro*, *in vivo* o por medio de cálculos estequiométricos. Entre las técnicas *in vivo* están: las cámaras de respiración de circuito abierto, el sistema comercial GreenFeed®, la técnica de trazador hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>), técnicas micro-meteorológicas, head boxes, politonel, entre otras. Sin embargo, las cámaras de respiración de circuito abierto es el método más preciso para mediciones *in vivo* (Pinares-Patiño y Waghorn, 2012). Aunque las cámaras de respiración de circuito abierto constituyen la metodología más precisa, tiene algunas desventajas, algunas de ellas son el alto costo y que no puede ser utilizada en animales en pastoreo. La técnica con trazador SF<sub>6</sub> es ampliamente utilizada en rumiantes en pastoreo (Woodward *et al.*, 2006). Estudios en borregos y bovinos han indicado que el metano cuantificado mediante la técnica de trazador SF<sub>6</sub> constituye entre el 93 y el 95% (McGinn *et al.*, 2006) del metano cuantificado en cámaras de respiración de circuito abierto y 105% del metano cuantificado mediante la técnica de Head boxes (Boadi *et al.*, 2002). La subestimación con la técnica de trazador SF<sub>6</sub> comparada con las cámaras de respiración de circuito abierto puede ser debido a que ésta no mide el CH<sub>4</sub> que es expulsado vía rectal. Las técnicas utilizadas para la cuantificación de CH<sub>4</sub> entérico tienen la desventaja de que pueden modificar el comportamiento animal, en especial su consumo el cual está directamente relacionado con la producción de CH<sub>4</sub> entérico.

En el laboratorio de Cambio Climático y Ganadería de la Universidad Autónoma de Yucatán se cuenta con dos cámaras de respiración de circuito abierto. Las cámaras tienen un volumen de 9.3 m<sup>3</sup>, apto para alojar animales de hasta 450 kg de peso vivo. Las cámaras cuentan con comederos con capacidad de hasta 40 kg de forraje en base fresca y bebederos automáticos. Para mantener la temperatura a 23 °C y la humedad relativa a 55% dentro de la zona de confort de los animales, las cámaras cuentan con aire acondicionado (Mirage, EXF121D, Bristol International, México) de 12.000 BTU, un deshumificador (Green Soleusa Air, Excell Industrias-Miami, Florida, EE.UU.) y un pequeño ventilador para la mezcla homogénea del aire dentro de la cámara. En la parte posterior de la cámara se cuenta con una rejilla y una bandeja para la recolección de las heces y orina de los animales para estudios metabólicos. En la parte delantera están ubicadas dos ventanas

de acrílico de 9 mm a ambos lados que permiten que los animales puedan observar y disminuir el estrés que pueda ocasionar el encierro. Las cámaras de respiración de circuito abierto están provistas de una entrada de aire externo para permitir el recambio en un periodo de 20 minutos. El aire dentro de la cámara es extraído a través de una tubería por la acción de generadores de flujo de masas (Sable Systems International, Las Vegas, NE, USA) con una capacidad de 0 a 500 litros por minuto. Un multiplexer toma una muestra de aire que ingresa y lo dirige a una columna desecante de drierita (sulfato de calcio, WA Hammond Drierite Company LTD, Xena, OH, EE.UU.) antes de que la muestra de aire entre al analizador infrarrojo de CH<sub>4</sub> (M-10, Sables Systems International, Las Vegas, NE, EE.UU.). Las lecturas son enviadas a la computadora y transformados en litros de CH<sub>4</sub> por el software ExpeData (Sable Systems International, Las Vegas, NE, EE.UU.). La linealidad del analizador de CH<sub>4</sub> se evalúa inyectando cuatro concentraciones diferentes (1.000, 2.500, 5.000, 7.000 ppm, Praxair, México) de metano diluido en nitrógeno. Las pruebas de calibración se evalúan mediante técnicas de regresión, obteniendo una R<sup>2</sup> de 0.999. Las cámaras de respiración fueron calibradas mediante pruebas gravimétricas a través de la infusión de CH<sub>4</sub> ultrapuro (Praxair, México) (99.999 %) dentro de las cámaras y su completa recuperación, con un porcentaje de 98 a 102% (Canul-Solis et al. 2017).



**Figura 4.** Cámara de respiración de circuito abierto, sección lateral.

## 2.7 Referencias

- Anantasook, N. & Wanapat M., 2012: Influence of Rain Tree Pod Meal Supplementation on Rice Straw Based Diets Using *In vitro* Gas Fermentation Technique. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 25 (3): 325.
- Anantasook, N., Wanapat, M., Cherdthong, A., & Gunun, P., 2013: Effect of plants containing secondary compounds with palm oil on feed intake, digestibility, microbial protein synthesis and microbial population in dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26 (6): 820-826.
- Anantasook, N.; Wanapat, M.; Cherdthong, A., 2014: 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.
- Animut, G.; Puchala, R.; Goetsch, A. L.; Patra, A. K.; Sahl, T.; Varel, V. H.; Wells, J., 2008: Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*, 144: 212–227.
- Babayemi, O.J., Inyang, U.A., Ifut, O.J.& Isaac, L.J. 2010: Nutritional Value of Cassava Wastes Ensiled with Albizia saman Pod as Feed for Ruminants in Off Season. *Agricultural Journal*, 5: 220
- Barbehenn, R.V. & Constabel, C.P., 2011: Review Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72: 1551–1565.
- Beltrán, J., 2012: Samanea saman como alimento para los rumiantes. Composición química del fruto y contribución de las semillas a su valor nutritivo. Tesis en opción al título de Maestro en Producción Animal para la Zona Tropical. Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba. 53 p.
- Blaxter, K. L., & Clapperton, J. L., 1965: Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of nutrition*, 19(01): 511-522.
- Boadi, D. A., K. M. Wittenberg, and A. D. Kennedy. 2002. Validation of the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer gas technique for measurement of methane and carbon dioxide production by cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 82:125–131.
- Carmona, J. C., Bolívar, D. M. & Giraldo, L. A. 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*, 18: 49-63.
- Solis, J. R. C., Vázquez, A. T. P., Castillo, J. I. A., Gamboa, J. A. A., Burgos, A. J. A., Pérez, C. F. A., ... & Vera, J. C. K. (2017). Design and construction of low-cost respiration chambers for ruminal methane measurements in ruminants. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(2): 185-191.
- Cecconello, G.C., Benezra, M.S. & Ovispo, N.E., 2003: Composición química y degradabilidad ruminal de los frutos de algunas especies forrajeras leñosas de un bosque seco tropical. *Zootecnia Tropical*, 21:149.

- Crutzen, P. J., Aselmann, I., Seiler, W., 1986: Methane produced by domestic animals, wild ruminants. *Tellus B*, 28: 271-284.
- Czerkawski, J. W., 1986: An introduction to Rumen Studies. Pergamon Press, New York, USA.
- Delgado D., 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 (3): 205-212.
- DOF, 2012. Ley General de Cambio Climático. Cámara de Diputados del Honorable Congreso de la Unión. Diario Oficial de la Federación, México.
- Durmic Zand Blache, D., 2012: Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology* 176: 150-162.
- Eckard, R. J., Grianger, C., de Klein, C. A. M., 2010: Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Science*, 130: 47-56.
- FAO. 2011. How to feed the world in 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. [En línea] Disponible en: URL [www.fao.org/fileadmin/.../wsfs/.../How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/.../wsfs/.../How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf). [Consultado Feb. 2017].
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H., Sand, P. & Becker, K., 2002: The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88: 587-605.
- Galindo J, N González, D Delgado, A Sosa, Y Marrero, R González, AI Aldama, O Moreira. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Tropical*, 26: 249-252.
- Galindo, J., González, N., Scull, I., Marrero, Y., Sosa, A., Aldana, A., et al. 2012: Efecto de Samanea saman (Jacq.) Merr., Albizia lebbeck (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.
- Galindo, J., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., ... & Sarduy, L., 2014: Efecto del follaje de plantas tropicales en el control de la producción de metano y la población de protozoos ruminales in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48 (4):359-364.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Herderson, B., Mottet, a., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G., 2013: Tackling climate change through livestock- a global assessment of emission and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization (FAO), Roma. P p. 206.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 770-777.

- Harrison, M.T., McSweeney, C., Tomkins, N. & Eckard, R.J., 2015: Improving greenhouse gas emissions intensities of subtropical and tropical beef farming systems using *Leucaena leucocephala*. *Agricultural Systems*, 136: 138–146.
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Díaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R., Machmüller, A., 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 79–94.
- Hu, W.L.; Liu, J.X.; Ye, J.A.; Wu, Y.M.; Guo, Y.Q., 2005: Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 120: 333-339.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). *Climate change 2007: The Physical Science Basis. Fourth Assessment Report*
- Irmgard, I., 1996: The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. *Environmental Monitoring Assess*, 42: 57-72.
- Jetana, T., Usawang, S., Thongruay, S., Vongpipatana, C. & Sophon, S. 2007: Effects of *Leucaena leucocephala* and *Samanea saman* on apparent digestibility and microbial nitrogen production in the rumen of Brahman cattle (*Bos indicus*) fed Pangola (*Digitaria eriantha*) hay as a basal diet. In: *Proceedings of an international forage symposium “Forages: A pathway to prosperity for smallholder farmers”* (Ed. M. D.Hare y K. Wongpichet). March 5-7, 2007, Ubon Ratchathani University, Thailand.
- Jetana, T., Usawang, S., Thongruay, S., Vongpipatana, C. & Sophon, S., 2008: Effects of replacement of *leucaena* (*Leucaena leucocephala*) with rain tree pod (*Samanea saman*) as a protein-rich supplement for cattle production. In: *Proceedings of the 46th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart, 29 January - 1 February, 2008. Subject: Animals and veterinary medicine, 2008, pp. 39-45.*
- Johnson, D. E., & Ward, G. M., 1996: Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*. 42(1–2): 133-141.
- Johnson, K. A. & Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73, 2483-92.
- Kamra, D.N., Agarwal, N. & Chaudhary, L.C., 2006: Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 1293: 156–163.
- Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A., Weiss, W. P. & Tricarico, J.M., 2014 Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*. 97:3231-3261.
- Kurihara, M.; Magner, T.; Hunter, R.A.; McCrabb, G., 1999: Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *The British Journal of Nutrition* 81, 227-34.
- Makkar, H. P., Sen, S., Blümmel, M., & Becker, K., 1998: Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4324-4328.

- Mao, H.-L., Wang, J.-K., Zhou, Y.-Y. & Liu, J.-X. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129, 56-62.
- Mao, H.-L., Wang, J.-K., Zhou, Y.-Y. & Liu, J.-X. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129: 56-62.
- Marienhagen, J. & Bott, M., 2013: Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of Biotechnology*, 163: 166– 178.
- McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh, J. F., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. W., 2010: *Animal Nutrition*. 7th edition. Pearson Canada; 2010. 258p.
- McGinn, S. M., Beauchemin, K. A., Iwaasa, A. D., McAllister, T. A., 2006: Assessment of the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique for measuring enteric methane emissions from cattle. *Journal of Environmental Quality*, 35:1686–1691.
- McMichael A.J., Powles JW, Butler CD, Uauy R (2007) Food, livestock production, energy, climate change, and health. *Lancet*. 370(9594):1253–1263.
- McSweeney CS, B Palmer, R Bunch, DO Krause. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal feed science and technology*. 91: 83-93.
- McKenzie, R. L., Björn, L. O., Bais, A., & Ilyasd, M., 2003. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(1), 5-15.
- Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., Fulford, J. D. & Puchala, R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*, 84: 2546-54.
- Min, B. R.; Solaiman, S.; Shange, R.; Eun, J. S., 2014: Gastrointestinal bacterial and methanogenic archaea diversity dynamics associated with condensed tannin-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *International Journal of Microbiology* 11: 1–11.
- Molina-Botero, I.C., Cantet, J.M., Montoya, S., Correa-Londoño, G.A. & Barahona-Rosales, R., 2013: Producción de metano in vitro de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8 (2).
- Moss, A. R., Jouany, J.P. & Newbold, J. 2000. *Methane production by ruminants: its contribution to global warming*. 3 ed. EDP Sciences.
- Naumann, H. D., Muir, J. P., Lambert, B. D., Tedeschi, L. O. & Kothmann, M. M., 2013: Condensed tannins in the ruminant environment: A perspective on biological activity. *Journal of Agricultural Science*, 1:8–20.
- Officer, P. 2016. Food and agriculture organization of the United Nations.

- Oleszek W.A., 2002: Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography, A*, 967: 147-162.
- Orskov, E.R., Flatt, W.P., Moe, P.W., 1968: Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation. *Journal of Dairy Science*, 51:1429-1435.
- Ortega, E. 2012. Potencial productivo de *Guazuma ulmifolia* Lam. en bancos de forraje y asociados a gramíneas tropicales. Tesis Maestría, Colegio de posgraduados Campus Veracruz, Veracruz, México, 110 p.
- Ortiz, D., Posada, S. & Noguera, R., 2014. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol 6: 211
- Patra, A. K. & Saxena, J. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22: 204-219.
- Patra, A. K. & Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, 1198-1222.
- Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R., Takahashi, J. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129 (3-4): 175 – 186.
- Peña, C., 2007: Caracterización y estudio de la reactividad de extractos tánicos condensados e hidrolizables. Análisis de las propiedades físico-químicas y mecánicas de resinas fenólicas de tipo novolaca modificadas con dichos extractos. Escuela universitaria politécnica. Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente. Donostia, San Sebastián <http://www.ehu.es/argitalpenak/images/stories/tesis/Ciencias/Caracterizacion%20y%20estudio%20de%20la%20reactividad%20de%20extractos%20tanicos%20condensados%20e%20hidrolizables.pdf>
- Pérez, N., Ibrahim, M., Villanueva, C., Skarpe, C., & Guerin, H., 2012: Uso de la diversidad forrajera tropical en combinaciones pareadas de leñosas forrajeras como indicador de preferencia para su inclusión en el diseño de sistemas silvopastoriles en zonas secas. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(1), 79-88.
- Pinares-Patiño C.; Garry W., 2012: Technical Manual on Respiration Chamber Designs. Ministry of Agriculture and Forestry. New Zeland.
- Piñeiro-Vázquez, A. T., Jiménez-Ferrer, G. O., Chay-Canul, A. J., Casanova-Lugo, F., Díaz-Echeverría, V. F., Ayala-Burgos, A. J. & Ku-Vera, J. C., 2017: Intake, digestibility, nitrogen balance and energy utilization in heifers fed low-quality forage and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology*.

- Podolak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D., 2010: Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9(3): 425-474.
- Preston, T.R. & Leng, R.A., 1989: Friendly development. *Livestock Research for Rural Development*, 1(1). URL: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd1/1/preston.htm>
- Primavesi, O., Shiraishi, R. T., Dos Santos, M., Aparecida, M., Teresinha, T. & Franklin, P., 2004: Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 39 (3): 277-283.
- Puchala, R., Animut, G., Patra, A.K., Detweiler, G.D., Wells, J.E., Varel, V.H., Sahlu, T., 2012: Methane emissions by goats consuming *Sericea lespedeza* at different feeding frequencies. *Animal Feed Science and Technology*, 175: 76– 84 77.
- Ramírez, J. F., Posada Ochoa, S. & Noguera, R. 2014. Ruminant methanogenesis and mitigation strategies. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 9: 307-323.
- Rayos, A. A., Robles, A. Y., Atega, T. A., & Alinea, C. B., 2003: Leaf Meals of *Gliricidia Sepium* and *Samanea Saman* as Protein Supplements for Goats. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(1): 1-1.
- Rock, F., 1920: Leguminous trees of Hawaii. Honolulu: Hawaiian Sugar Planters' Association Experiment. Station. 234 p.
- Sackey, J. P., 2010: Chemical and Mineral Composition of *Samanea saman* Pods. BSc. Agriculture Dissertation, Department of Animal Science, K.N.U.S.T., Ghana.
- Salem, A., Hassam, A., Khalil, M., Gado H, Alsersy H., Simbaya J., 2012: Effects of sun-drying and exogenous enzymes on nutrients intake, digestibility and nitrogen utilization in sheep fed *Atriplex halimus* foliage. *Animal Feed Science Technology*, 171 (2–4):128–135.
- Schäfer, G., Engelhard, M., & Müller, V., 1999: Bioenergetics of the Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3): 570-620.
- Selvam, V., 2007: Trees and shrubs of the Maldives. *Trees and shrubs of the Maldives*. RAP Publication No. 2007/12. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- Soliva, C.R., Zeleke, A.B., Clement, C., Hess, H.D., Fievez, V., Kreuzer, M., 2008: In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 53–71.
- Soltan YA, AS Morsy, SMA Sallam, H Louvandini, AL Abdalla. 2012. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (*prosopis*, *acacia*, *atriplex*, and *leucaena*) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of animal feed science*. 21: 759-772.
- Solomon, S. (Ed.). 2007: Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC (Vol. 4). Cambridge University Press.



- Sparg, S. G., Light, M., Van Staden, J., 2004: Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 219-243.
- Staples, G.W. & Elevitch, C.R., 2006: *Samanea saman* (rain tree). Species profiles for Pacific Island Agroforestry. Disponible: [www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org) [Consultado: mar. 2017]
- Tamashiro, M.; Mitchell, W.C., 1976: Control of three species of caterpillars that attack monkey-pod trees. Misc. Pub. 123. Honolulu, HI: University of Hawaii Agriculture. Experiment Station. 4 p.
- 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 Technology*, 123-124, 403–419.
- Ulyatt, M. J., & Lassey, K. R., 2005: Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 9(2).
- Valencia-Salazar, S. S., Piñeiro-Vázquez, A. T., Molina-Botero, I.C., Lazos-Balbuena, F. J., Uuh-Narváez, J. J., Segura-Campos, M. R., Ramírez-Avilés, L., Solorio-Sánchez, F. J., Ku-Vera, J. C., Potential of *Samanea saman* pod meal for enteric methane mitigation in crossbred heifers fed low-quality tropical grass (enviado a: *Agricultural and Forest Meteorology*).
- Van Nevel, C.J. & Demeyer, D.I., 1996: Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment* 42: 73-97.
- Vargas, J., Cárdenas, E., Pabón, M. & Carulla, J., 2012: Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Archivos de Zootecnia*, 61(R):51-66
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. & Gruppen, H., 2007: Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68: 275-297.
- Waghorn, G., 2008: Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 116–139.
- Wolin, M. J., 1960: A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43: 1452.
- Woodward, S. L., G. C. Waghorn, and N. A. Thomson. 2006: Supplementing dairy cows with oils to improve performance and reduce methane—Does it work? *Proceedings New Zealand Society of Animal Production*, 66:176–181.
- Yanez-Ruiz, D. R., Hart, K.J., Belanche, A., Martin-Garcia, A.I. & Newbold, C.J., 2007: The effect of protozoa on methane emissions by lambs. In “*Proceedings of the British Society of Animal Production*”.

## CAPÍTULO III

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### **Hipótesis**

La incorporación de frutos de *Samanea saman* en la ración de novillas cruzadas (*Bos Taurus* × *B. indicus*) alimentadas con *Pennisetum purpureum* modifican la fermentación ruminal y reducen la producción de metano entérico, sin afectar el consumo y la digestibilidad de los componentes de la ración.

#### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la inclusión de niveles del fruto molido de *S. saman* en la ración sobre el consumo, digestibilidad, fermentación ruminal y producción de metano entérico en novillas cruzadas (*Bos taurus* × *B. indicus*) y alimentadas con una dieta a base de pasto *Pennisetum purpureum*.

#### **Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de la inclusión de niveles crecientes de fruto molido de *S. saman* en la ración sobre el consumo y la digestibilidad aparente en novillas cruzadas.

Evaluar los patrones de fermentación ruminal de novillas alimentadas con niveles crecientes de *S. saman* en la ración a base de *P. Purpureum*.

Determinar el efecto de los taninos condensados y saponinas contenidas en los frutos de *S. saman* sobre la población protozoaria en el líquido ruminal de novillas alimentadas con niveles crecientes de *S. saman* en una dieta a base de pasto *P. purpureum*.

Cuantificar la producción de metano entérico en novillas cruzadas alimentadas con niveles crecientes de fruto molido de *S. saman* en una dieta a base de pasto *P. purpureum*.

**CAPÍTULO IV**  
**ARTÍCULO CIENTÍFICO**

Artículo científico preparado acorde a las instrucciones de la revista Agricultural and Forest  
Meteorology para la edición especial:

Greenhouse gas and ammonia emissions from livestock production systems

**Potential of *Samanea saman* pod meal for enteric methane mitigation in crossbred heifers  
fed low-quality tropical grass**

Sara S. Valencia Salazar<sup>a\*</sup>, Angel T. Piñeiro Vázquez<sup>b</sup>, Isabel C. Molina Botero<sup>a</sup>, Freddy J.  
Lazos Balbuena<sup>a</sup>, Jonatan J. Uuh Narváez<sup>c</sup>, Maira R. Segura Campos<sup>c</sup>, Luis Ramírez Avilés<sup>a</sup>,  
Francisco J. Solorio Sánchez<sup>a</sup>, Juan C. Ku Vera<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. C.P. 97300  
Mérida, Yucatán, México.*

<sup>b</sup>*Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico s/n Conkal, Yucatán, C.P. 97345.*

<sup>c</sup>*Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán C.P. 97300  
Mérida, Yucatán, México.*

\* *corresponding author:* S.S. Valencia-Salazar: [saraudea@gmail.com](mailto:saraudea@gmail.com)

**Potential of *Samanea saman* pod meal for enteric methane mitigation in crossbred heifers fed low-quality tropical grass**

Sara S. Valencia Salazar<sup>a\*</sup>, Angel T. Piñeiro Vázquez<sup>b</sup>, Isabel C. Molina Botero<sup>a</sup>, Freddy J. Lazos Balbuena<sup>a</sup>, Jonatan J. Uuh Narváez<sup>c</sup>, Maira R. Segura Campos<sup>c</sup>, Luis Ramírez Avilés<sup>a</sup>, Francisco J. Solorio Sánchez<sup>a</sup>, Juan C. Ku Vera<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. C.P. 97300 Mérida, Yucatán, México.*

<sup>b</sup>*Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico s/n Conkal, Yucatán, C.P. 97345.*

<sup>c</sup>*Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán C.P. 97300 Mérida, Yucatán, México.*

\* *corresponding author: S.S. Valencia-Salazar: [saraudea@gmail.com](mailto:saraudea@gmail.com)*

**Abstract**

Pods of *Samanea saman* have been reported to be effective in mitigating methane (CH<sub>4</sub>) emissions in ruminants. The aim of this study was to evaluate the effect of inclusion of *S. saman* pod meal in the ration on feed intake, apparent digestibility, rumen fermentation, rumen degradation, protozoa population, and enteric CH<sub>4</sub> emissions in crossbred heifers fed low-quality tropical grass. Four crossbred heifers (*Bos taurus* × *B. indicus*) with an average live weight (LW) of 261.5 ± 1.29 kg were used in a 4 × 4 Latin square design with four periods of 23 days (17 days for adaptation and 6 days for measurements of response variables). Levels of inclusion of *S. saman* ground pods in the ration were 0, 10, 20 and 30% of dry matter (DM). Enteric CH<sub>4</sub> emissions were measured using open-circuit respiration chambers. Incorporation of *S. saman* levels had no effect on dry matter intake (DMI) (P>0.05), apparent digestibility of dry matter (DM) and organic matter (OM) (P>0.05) nor protozoal count (P>0.05). It was found that molar proportion of propionic acid in rumen liquor was increased (P<0.05), while that of acetic acid and acetic: propionic ratio was

linearly decreased ( $P < 0.01$ ) when heifers were supplemented with *S. saman*. Additionally, emissions of enteric  $\text{CH}_4$  showed a linear reduction as the inclusion of *S. saman* in the ration was increased ( $P = 0.007$ ). A reduction of 50.9% of  $\text{CH}_4$  (L/day) and 56.9% (L/kg DMI) was observed at the highest inclusion level of *S. saman* compared to the control diet ( $P < 0.05$ ). It is concluded that, the inclusion of *S. saman* pods in the ration has the capacity to reduce energy losses in the form of methane emissions in heifers fed low-quality tropical grass.

**Keywords:** greenhouse gas, respiration chambers, volatile fatty acids, tropical resources.

## 1. Introduction

At present, there is a worldwide growing concern regarding global warming as a result of the accumulation of greenhouse gases (GHG) in the atmosphere arising from anthropogenic activities. Mexico is the seventh major beef producer globally with 1.8 million tons produced a year (FAO, 2011) and more than 33 million head of cattle, most of them grazing in extensive systems (SIAP, 2015) concentrated in the dry and humid tropical regions. Under traditional grazing conditions of low quality grass, cattle are associated with high GHG emissions (Archimède et al., 2011). This results in the degradation of natural resources and low production parameters, making production systems less profitable and unsustainable for the environment in the long term. Methane is the main GHG by-product of ruminal fermentation and constitutes a loss of energy (up to 12% of gross energy intake) for the animal (Johnson and Johnson, 1995). Considering this, enteric methane contributes with 39.1% of GHG from livestock (Gerber et al., 2013). therefore, it is important to establish alternatives that reduce these emissions, or increase the efficiency of animal production.

Inclusion of supplements in the feed ration with high levels of protein and energy content makes ruminal fermentation more efficient when basal rations are low-quality grass (Poppi and McLennan, 1995). Therefore, improving animal performance and reducing  $\text{CH}_4$  emissions per unit of synthesized product (L  $\text{CH}_4$ /kg of meat produced). In addition, the implementation of diets containing secondary metabolites which have the capacity to alter the rumen microbial population and rumen fermentation processes constitutes an alternative to reduce  $\text{CH}_4$  emissions in the tropics. Several authors have reported that the use of compounds such as saponins, condensed tannins (CT)

and essential oils reduce the synthesis of CH<sub>4</sub> in the rumen (Knapp et al., 2014; Patra et al., 2017). In recent years, research has been carried out on the use of tropical forages, such as trees and shrubs, which, in addition to their potential for ruminant feeding, contain a wide variety of secondary metabolites (Patra et al., 2017; Albores-Moreno et al., 2017). *S. saman* is an alternative as a dietary supplement due to the high production of pods during the dry season (Delgado, 2014; Anantasook et al., 2015) and its high nutritional quality. *S. saman* contains secondary metabolites (CT and saponins) with anti-methanogenic potential (Anantasook et al., 2015) by means of increasing the proportion of propionic acid and consequently decreasing the availability of H<sub>2</sub> for the *archaeas* for the synthesis of CH<sub>4</sub>.

The objective of this study was to evaluate the effect of different levels of inclusion of ground pods of *S. saman* in the ration on feed intake, apparent digestibility, protozoa population and enteric CH<sub>4</sub> emissions in heifers fed a basal ration of *Pennisetum purpureum* grass.

## **2. Materials and methods**

Heifers were treated in accordance with guidelines and regulations for animal experimentation and welfare of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ) of the University of Yucatan, Merida, Mexico. Experimental methodology was approved by the ethics committee of FMVZ.

### **2.1. Location**

The experiment was carried out from August to November 2016 at the Laboratory of Climate Change and Livestock Production of FMVZ, University of Yucatan located at 21°15'N 83° 32'W in Merida, Mexico. The region has a AW0 climate type with annual average rainfall of 984.4 mm and temperature of 26.8 °C (Garcia, 1981).

### **2.2. Experimental Animals**

Four crossbred heifers (*Bos taurus* x *B. indicus*) with an average LW of 261.5 ± 1.29 (μ±SD) kg were used. Heifers were housed individually in metabolic crates located in a roofed building with

concrete floor and without walls. Before the experiment began, animals were dewormed with Dectomax® (Dose:1 mL/50 kg LW) and ADE (Vigantol ADE®) vitamins which were applied intramuscularly (Dose: 1 mL per each 10 kg LW). For one month before the experiment, heifers were habituated to the respiration chambers by housing them inside for increasingly longer periods of time. This was done until the time when DM intake was the same both inside as outside the chambers, and the heifers were considered to be accustomed.

### 2.3. Experimental design

A 4 × 4 Latin square design was used (Cochran and Cox, 1991), and each treatment period lasted for 23 days. In order to minimize the residual effect of the previous treatment, heifers were given a 17-day buffer period to adapt to the new ration and management, and 6 days for the measurement of response variables.

### 2.4. Experimental diets

Pods of *S. saman* were collected during April and May 2016 and dried in a forced-air oven at 55 °C for 48 h, ground in a hammer mill (Azteca, Monterrey, Nuevo León, México) to a ~3 mm particle size and stored in plastic containers. The basal diet was composed of chopped green grass fodder *P. purpureum*. The percentages of inclusion of the dried and ground pods of *S. saman* were 0, 10, 20 and 30% of the offered DM. The chemical composition of each ingredient and of the diets fed in the experiment is shown in Table 1. All rations were supplemented with soybean meal, wheat bran, and sugarcane molasses in different proportions as shown in Table 2. Additionally, to the diets, minerals were offered at 65 g/day/animal and had free access to water at all times. Rations were offered at 0900 h considering a dry matter intake of 2.5% of LW (NRC, 2001). In order to ensure that heifers consumed the total amount of *S. saman* pod meal, they were first offered a mixture of the pods and the other ingredients, and then chopped green grass of *P. purpureum*.

**Table 1.** Chemical composition (g/kg DM) of the ingredients of experimental diets

Items	<i>S. saman</i>	<i>P. purpureum</i>	Soybean meal	Wheat bran	Molasses
Organic matter	964.2	932.7	925.8	934.1	881.0
Crude protein	149.5	67.4	473.2	180.7	31.5
Neutral detergent fiber	304	647	152.6	460.2	ND
Acid detergent fiber	231	394	166.7	143.1	ND
Ether extract	15.7	ND	ND	ND	ND
Total starch	180.9	ND	ND	200*	ND
Gross energy (MJ/kg DM)	17.8	15.6	18.12	17.58	14.69
Condensed tannins	12.1	ND	ND	ND	ND
Saponins	15.7	ND	ND	ND	ND

DM; dry matter: ND; not-determined. \*From FEDNA tables.

**Table 2.** Proportion of ingredients in the experimental diets and chemical composition of experimental diets

	Treatments			
	0	10	20	30
Ingredients (% DM)				
<i>S. saman</i>	0	10	20	30
<i>P. purpureum</i>	87	80	73.5	66.5
Soybean meal	7	5	3	1
Wheat bran	3	3	2.5	2
Molasses	3	2	1	0.5
Chemical composition (g/kg DM) *				
Organic matter	930.7	934.5	938.3	941.8
Crude protein	98.1	98.5	98.4	98.1
Neutral detergent fiber	587.3	569.4	552.4	532.1
Acid detergent fiber	358.7	350.9	344.3	335.8
Total starch	6.0	24.1	41.2	58.2
Gross energy (MJ/kg DM)	15.8	15.9	16.1	16.3
Condensed tannins	0	1.2	2.4	3.6
Saponins	0	1.6	3.1	4.7

DM: dry matter. \*Calculated with data on table 1.

## 2.5. Intake and apparent digestibility

Dry matter, organic matter (OM), and neutral detergent fiber (NDF) intakes were determined as the difference between the amount of nutrients offered and what was refused (24 h period). Feed



refusals were collected, weighed, and sampled each day for chemical analysis. Digestibility was determined by the method described by Schneider and Flatt (1975). Total production of feces were collected and weighed every day, and an aliquot of 10% was taken. Fecal samples were pooled for each period and treatment, and a subsample was used for chemical analysis.

## 2.6. Methane production

Enteric CH<sub>4</sub> (L/d) production by heifers was measured using two open-circuit respiration chambers (Pinares-Patiño and Waghorn, 2012; Canul-Solís et al., 2017) with an internal volume of 9.38 m<sup>3</sup>. The air inside the chambers was extracted by mass flow generators (Flowkit, Sable Systems International®, USA) at a rate of 300 L per minute creating a pressure of 275 Pa below external pressure. A subsample of the air extracted from the chamber was extracted into an infrared CH<sub>4</sub> analyser (MA-10 Sable Systems International, USA) using a multiplexer. Heifers entered the respiration chambers in pairs (one in each chamber) for 23 h per day for three consecutive days. Temperature and relative humidity inside the chambers were kept at 23 °C and 55% respectively. Data were extrapolated to 24 h using ExpeData® software (Sable Systems International®, USA).

The infrared CH<sub>4</sub> analyzer was calibrated before each experimental period using pure nitrogen and a known concentration of methane (1,000 ppm, Praxair®, Mexico) diluted in nitrogen. The linearity of the analyzer was assessed by injecting four known concentrations (1000; 2500, 5000 and 7500 ppm; Praxair®, Mexico) of CH<sub>4</sub> diluted in nitrogen. The analyser responded linearly to known concentrations of CH<sub>4</sub> with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.9993. The chamber system was calibrated by the injection of high purity CH<sub>4</sub> (99.997%; Praxair®, Mexico) into the chambers to determine the recovery percentage of CH<sub>4</sub> by gravimetry among the amount of methane released and the methane recovered by the analyser. The recovery percentage of CH<sub>4</sub> fluctuated between 97-102% which is consistent with recovery values at other laboratories (Gardiner et al., 2015; Machado et al., 2016).

## 2.7. Protozoa count

A sample of rumen liquor (30 mL) was taken on day six of the trial, six hours postprandial, as suggested by Bhatta et al. (2013) using an esophageal tube (Ramos-Morales et al., 2014). Rumen

pH was measured after obtaining the sample with a portable potentiometer (HANNA® Instruments, Woonsocket, USA), which was calibrated with reference buffers at pH's 4 and 7. Rumen liquor samples were filtered through two layers of cheesecloth. Protozoa count was carried out using the methodology described by Rosales (1989). One mL of rumen liquor was mixed with 1 mL of MSF solution (35 mL/L formaldehyde, 0.14 mM NaCl and 0.92 mM methylgreen solution) and centrifuged at 2,000 rpm for 20 min. An aliquot of 1 µL was taken and introduced to a modified Fusch-Rosenthal chamber (IVD 98/79 CE) and observed under the microscope (Mikon®-YS100) at 40X. The number of ciliate protozoa was reported as  $\log_{10}$  from total number + 1 per mL of rumen liquor. The number of protozoa was estimated using the following formula (FAO, 2003):  $\text{Number of cells per mL}^{-1} = [(n_1+n_2+n_3+n_4+n_5)/5]/0.022 \text{ mm}^3 \times 10^3 \times d$ . where:  $n_1 \dots n_5$ : number of protozoa per large square and  $d$  = dilution factor. Classification of ciliate protozoa was performed according to Ogimoto and Imai (1981).

## 2.8. Rumen degradation of *S. saman*

Additionally, measurements of rumen degradation of DM of *S. saman* pods were carried out in three ruminally cannulated crossbred cows (*Bos taurus* × *B. indicus*). Cows were fed for 2 weeks with a ration based on chopped *P. purpureum* grass and supplemented with commercial concentrate (80:20). Samples of pods, husks and seeds were ground to pass through a 3-mm sieve. The *in situ* technique of Ørskov et al. (2000) was used, using nylon bags of dimensions 7×14 cm (width and length), and with a pore size of 53 µ (Lockertex®, Warrington, England). Samples of 5 g were introduced in each bag. Rumen incubation times were: 0, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h. Bags were introduced by triplicate to each cow at each incubation time. Time 0 (T0) was measured by taking triplicate nylon bags containing the samples and washed using a domestic washing machine without being incubated in the rumen. Percentage of DM degradation in the rumen was determined as the difference between DM incubated in the rumen and that remaining after incubation (Ørskov and McDonald, 1979). In order to estimate rumen degradation constants for DM, percent loss at different incubation times was introduced into the software NOWAY (Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland) and data were adjusted to the nonlinear equation proposed by Ørskov and McDonald (1979).

## 2.9. Chemical analysis

The collected samples of feed and feces were ground to pass through a 1-mm sieve for analysis according to the AOAC (1990). Dry matter content of forage, refusals and feces were determined by drying samples in a forced-air oven at 57 °C for 48 h (constant weight). Nitrogen (CP= N × 6.25) determinations were carried out with a LECO® CN-2000 series 3740 instruments (LECO® Corp., St. Joseph, MI) (AOAC, method number 992.15). Organic matter content of the samples was determined by combustion in a muffle furnace at 550 °C (AOAC, method number 923.03) and the concentration of NDF and ADF were determined as suggested by Van Soest et al. (1991). Gross energy (GE) was measured using a bomb calorimeter (C200, IKA Works® Inc., Staufen, Germany). Energy loss as CH<sub>4</sub> was estimated using as reference the heat combustion of CH<sub>4</sub> (55.22 MJ/kg CH<sub>4</sub>) (Brouwer, 1965). Starch content in *S. saman* pods was determined using the methodology of Goñi et al. (1996). Measurement of CT content was determined using the Folincioaltea method according to Makkar et al. (1993). The content of saponins was determined using the calorimetric method proposed by Kerem et al. (2005). The type of aglycone of the saponin was identified by thin layer chromatography (TLC) following the modified method of Valencia et al. (2005) using the reagent of Liebermann-Buchard. Volatile fatty acids in rumen liquor were determined by gas chromatography according to Ryan (1980).

## 2.10. Statistical analysis

Intake, apparent digestibility, methane production and transformed data to Log<sub>10</sub> from protozoa counts (cells/mL of ruminal liquor) were subjected to analysis of variance for a 4 × 4 Latin square design (Cochran and Cox, 1991) using the procedure PROC ANOVA from SAS® 9.2 software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2006 with the model  $Y_{ijk} = \mu + P_i + A_j + T_k + E_{ijk}$ , where:  $Y_{ijk}$  is the dependent variable,  $\mu$  is the general mean,  $P_i$  is the effect of period,  $A_j$  is the effect of animal,  $T_k$  is the effect of treatment and  $E_{ijk}$  is the residual error. Additionally, surface response analysis was performed to determine the linear, quadratic or cubic effect of the evaluated treatments (SAS® Inst. Inc., Cary, NC, 2006).

### 3. Results

#### 3.1. Intake and apparent digestibility

Feed intake was not affected by the inclusion of the pods in the diet ( $P>0.05$ ). Average DM intake (kg/d, % LW, and g/kg<sup>0.75</sup>) of heifers were 6.33, 2.42, and 97.52 respectively ( $P>0.05$ ). Organic matter, NDF, ADF, and CP intakes were similar among treatments, with an average of 5.62, 3.55, 2.19 and 0.64 kg/d respectively. Gross energy intake (MJ/kg DM/d), and CP intake (g/d) increased linearly as the level of *S. saman* in the ration increased ( $P<0.01$ ) as shown on Table 3. As the level of inclusion of *S. saman* increased in the ration, intake of CT (g/d) and saponins (g/d) increased linearly ( $P<0.01$ ). The type of aglycone identified in the saponin of *S. saman* was triterpenic. Apparent digestibility of DM, OM and NDF was similar among treatments with a range from 591 to 635 g/kg of DMI ( $P>0.05$ ). However, a quadratic effect was observed on the digestibility of the DM when the inclusion of *S. saman* increased in the ration ( $P<0.05$ ). Digestible DM and OM intakes was similar between treatments ( $P>0.05$ ).

**Table 3.** Intake and digestibility in heifers fed *P. purpureum* and increasing levels of *S. saman*

Items	Level of incorporation of <i>S. saman</i> in the ration (% of DM)					P-value	Contrast		
	0	10	20	30	SE		L	Q	C
<b>LW (kg)</b>	262	261	263	260	0.64				
<b>Intake</b>									
<b>DM (kg/d)</b>	6.26	6.44	6.16	6.49	0.28	0.66	ns	ns	ns
<b>DM (% LW)</b>	2.39	2.47	2.34	2.49	0.09	0.45	ns	ns	ns
<b>DM (g/kg<sup>0.75</sup>)</b>	96.25	99.45	94.22	100.17	3.57	0.50	ns	ns	ns
<b>OM (kg/d)</b>	5.85	5.81	5.36	5.47	0.24	0.28	ns	ns	ns
<b>CP (g/d)</b>	613.40	644.46	639.22	670.36	49.08	0.15	*	ns	ns
<b>NDF (kg/d)</b>	3.42	3.76	3.46	3.58	0.23	0.62	ns	ns	ns
<b>ADF (kg/d)</b>	2.07	2.31	2.15	2.25	0.13	0.54	ns	ns	ns
<b>MJ/kg DM</b>	15.82	15.99	16.19	16.32	0.08	<0.0001	**	ns	ns
<b>CT (g/d)</b>	0.00	7.69	15.6	23.3	0.54	<0.0001	**	ns	ns
<b>Saponins (g/d)</b>	0.00	9.98	20.26	30.33	0.71	<0.0001	**	ns	ns
<b>Apparent digestibility (g/kg intake)</b>									

<b>DM</b>	591	635	603	595	2.03	0.08	ns	*	ns
<b>OM</b>	589	615	562	571	1.45	0.10	ns	ns	ns
<b>NDF</b>	537	591	519	531	3.24	0.32	ns	ns	ns
<b>Digestible intake (kg/d)</b>									
<b>DM</b>	3.70	4.09	3.72	3.85	0.20	0.12	ns	ns	*
<b>OM</b>	3.45	3.58	3.02	3.13	0.20	0.13	ns	ns	ns
<b>NDF</b>	1.85	2.23	1.82	1.92	0.23	0.43	ns	ns	ns

DM: dry matter; OM: organic matter; CP: crude protein; NDF: neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre; CT: condensed tannins; surface response: L: linear contrast; Q: quadratic contrast; C: cubic contrast; SE: standard error. \* P<0.05; \*\* P<0.01; ns, non-significant (P>0.05).

### 3.2. Fermentation parameters

Rumen pH was not affected by treatment (P>0.05), it ranged from 6.80 to 6.97. In contrast, molar proportions of VFA were significantly affected and showed a linear response to the inclusion of *S. saman* (Table 4). Particularly, molar proportion of propionic acid showed a linear increase as the level of *S. saman* was augmented (P=0.01), whereas acetic acid was significantly decreased (P=0.001), as shown in Table 4. A linear reduction was observed in the acetic: propionic ratio as the inclusion of *S. saman* pod meal in the ration increased. Potential degradation of DM of *S. saman* pods, seeds and husks was 79.6, 85.1, 79.01% respectively, as showed on Table 5.

**Table 4.** VFA molar proportions in the rumen of heifers fed *P. purpureum* and increasing levels of *S. saman*

Items	Level of incorporation of <i>S. saman</i> in the ration (% of DM)					SE	P-value	Contrast		
	0	10	20	30	L			Q	C	
<b>pH</b>	6.90	6.87	6.97	6.80	0.04	0.06	ns	ns	*	
<b>VFA (% molar)</b>										
<b>Acetic acid</b>	70.32	68.39	66.72	60.05	1.27	<.0001	**	ns	ns	
<b>Propionic acid</b>	17.66	18.45	19.88	21.77	1.20	0.01	**	ns	ns	
<b>Butyric acid</b>	9.7	10.98	10.97	15.20	0.59	<.01	**	ns	ns	
<b>Isobutyric acid</b>	0.74	0.57	0.48	0.40	0.06	0.03	**	ns	ns	
<b>Valeric acid</b>	0.69	0.98	1.44	2.10	0.13	<.01	**	ns	ns	
<b>Isovaleric acid</b>	0.79	0.61	0.49	0.45	0.12	0.01	**	ns	ns	

**Acetic: propionic ratio** 4.01 3.74 3.42 2.82 0.25 <.01 \*\* ns ns

VFA: volatile fatty acids; surface response: L: linear contrast; Q: quadratic contrast; C: cubic contrast; SE: standard error. \* P<0.05; \*\* P<0.01; ns, non-significant (P>0.05).

**Table 5. Rumen DM degradation (%) of different components of *S. saman* pods**

	Degradation parameters					
	T0	a	b	c	a+b	D 0.05
<b>Pods</b>	64.49b	62.46b	17.15b	0.04a	79.61b	53.01b
<b>Seed</b>	33.07c	46.86c	38.28a	0.05a	85.15a	67.56b
<b>Husks</b>	70.33a	70.47a	8.54c	0.05a	79.01b	54.19a
<b>P- Value</b>	<.0001	0.001	0.001	0.912	0.027	0.002
<b>SD</b>	0.160	9.842	12.559	0.026	3.038	2.985

DM degradation adjusted to the exponential equation:  $a+b(1-\exp^{-ct})$  (Ørskov et al. 2000) where “a” is the intercept of exponential equation of fitted values on “y”, B potentially degradable fraction, a+b degradation potential, “c” rate of degradation of “b” (per hour) D 0.05: effective degradability expected at a rate of rumen outflow of 0.05/h.

### 3.4. Methane production

A linear reduction (Table 6) in CH<sub>4</sub> output was found as a result of the inclusion of *S. saman* (P=0.007) in the diet. Methane emissions per animal were reduced 50.9% when expressed in liters per day, and 56.9% when quantified in liters per kg of DMI for the treatment with the highest level of inclusions of *S. saman* compared to the control diet (P =0.03). Loss of energy as CH<sub>4</sub> (MJ/animal/day) was different among treatments (P=0.03) and had a linear reduction as the inclusion of *S. saman* in the diet was increased. A reduction of 50.9% in energy loss was observed with the highest levels of inclusion of *S. saman* compared to the control diet

**Table 6. Enteric CH<sub>4</sub> production in heifers fed *P. purpureum* and increasing levels of *S. saman***

Items	Level of incorporation of <i>S. saman</i> in the ration (% of DM)					SE	P-value	Contrast		
	0	10	20	30	L			Q	C	
<b>CH<sub>4</sub> (L/d)</b>	120.84	89.63	72.03	59.30	9.39	0.03	**	ns	ns	
<b>CH<sub>4</sub> (L/kg DMI)</b>	19.04	13.95	12.65	8.19	1.09	0.00	**	ns	ns	
<b>CH<sub>4</sub> (L/kg OMI)</b>	20.51	15.44	13.54	10.75	1.46	0.04	**	ns	ns	
<b>CH<sub>4</sub> (L/kg NDFI)</b>	35.01	24.18	21.03	16.40	2.46	0.01	**	ns	ns	

<b>CH<sub>4</sub> (L/kg ADFI)</b>	57.94	39.23	33.64	26.20	3.93	0.07	**	ns	ns
<b>CH<sub>4</sub> (L/kg DDMI)</b>	32.97	21.93	19.40	15.48	2.64	0.03	**	ns	ns
<b>CH<sub>4</sub> (L/kg DOMI)</b>	34.73	25.11	24.44	18.86	2.61	0.05	*	ns	ns
<b>CH<sub>4</sub> (L/kg DNDFI)</b>	65.29	41.44	42.44	30.95	5.66	0.02	**	ns	ns
<b>Energy loss as CH<sub>4</sub> (MJ/ day)</b>	4.69	3.48	2.80	2.30	0.36	0.03	**	ns	ns
<b>Energy loss as CH<sub>4</sub> (% GE)</b>	4.70	3.38	2.82	2.15	0.31	0.01	**	ns	ns

CH<sub>4</sub> (L/d): Liters of CH<sub>4</sub> per day; DMI: dry matter intake; OMI: organic matter intake; NDFI: neutral detergent fiber intake; ADFI: acid detergent fiber intake; DDMI: digestible dry matter intake; DOMI: digestible organic matter intake; DNDFI: digestible neutral detergent fiber; GE: gross energy; surface response: L: linear contrast; Q: quadratic contrast; C: cubic contrast; SE: standard error; \* P<0.05; \*\* P<0.01; ns: non-significant (P>0.05).

### 3.5. Protozoa count

Inclusion of *S. saman* did not show any effect on rumen total protozoa, Holotrics and Entodiniomorphs (P>0.05) and no significant effects were found for linear, quadratic or cubic responses (Table 7).

**Table 7.** Protozoa population in heifers fed *P. purpureum* and increasing levels of *S. saman*

Items	Level of incorporation of <i>S. saman</i> in the ration (% of DM)				SE	P-value	Contrast		
	0	10	20	30			L	Q	C
<b>Protozoa log<sup>10</sup> (cell/mL)</b>									
<b>Holotrics</b>	4.33	4.47	4.65	4.58	0.31	0.14	ns	ns	ns
<b>Entodiniomorphs</b>	5.61	5.41	5.40	5.48	0.38	0.20	ns	ns	ns
<b>Total</b>	5.68	5.49	5.45	5.53	0.34	0.18	ns	ns	ns

SE: standard error; surface response: L: linear contrast; Q: quadratic contrast; C: cubic contrast; SE: standard error. \* P<0.05; \*\* P<0.01; ns, non-significant (P>0.05).

## 4. Discussion

Dry matter, OM, NDF and ADF intakes were not affected by dietary metabolite content (P>0.05), this is consistent with that reported by Anantasook et al. (2015) suggesting that the low content of CT and saponins content of *S. saman* had no effect on the acceptability of the ration. Beauchemin

et al. (2007) mentions that doses below 2% of CT does not affect DM intake. Crude protein and GE intakes significantly increased with the inclusion of pods in the ration, resulting in a significant linear response due to the better quality of the *S. saman* pod meal (CP: 14.9%) and the higher inclusion in the ration. Apparent digestibility of the ration was not significantly affected and DMD showed a quadratic response. Although DMD was not significantly affected a small reduction in NDFD was registered. A reduction in apparent digestibility of the fiber fraction can be attributed to a decrease in the population of cellulolytic bacteria in the rumen due to the additive effect of the CT and saponin contents in the *S. saman* pod meal. Galindo et al. (2012) evaluated the effect of *S. saman*, *Albizia lebbbeck*, and *Tithonia diversifolia* on the population of methanogens and observed a decrease in the cellulolytic bacteria with the inclusion of *S. saman*. Makkar et al. (1995) found that the interaction between quebracho tannins, tannic acid, and *Quillaja saponaria* was additive and significantly decreased the digestibility of fiber, although they suggested the results may be different with saponins and tannins from different sources.

A decrease in protozoa population was not observed, which differs from other studies. Several authors (Galindo et al., 2012; Anantasook et al., 2015) observed reductions in protozoa counts when *S. saman* pods were evaluated. Albores-Moreno et al. (2017) observed a reduction up to 40% on total protozoa counts when *Enterolobium cyclocarpum* was included in the ration (30-45% of DM). Saponins suppress methane production, can reduce rumen protozoa counts, and alter fermentation pattern (Makkar and Becker, 1997; Hristov et al., 1999). The lack of effect observed in the protozoa population in this study could be attributed to the adaptation of the protozoa to the saponins content of the ration. Several authors (Newbold et al., 1997; Ivan et al., 2004) observed a complete recovery of the protozoa population after 14 days of being subjected to a partial defaunation using saponins. The results found in this study are in agreement with those found by Ramírez-Restrepo et al. (2016) who did not observe an effect of tea seed saponins on protozoa population. The effect of saponins on protozoa populations depends on the dose, source and type of saponin and CT. Jayanegara et al. (2011) reports that the effect of CT on protozoa population can be observed in a ration of 2% contents of CT. However, concentration of saponins and CT in this study reached a maximum level of 30.5 y 23.5 g/d respectively. It is possible that the low concentration of secondary metabolites did not affect protozoa population.



Enteric methane emissions showed a significant linear reduction as the percentage of *S. saman* levels increased in the ration. Galindo et al. (2014) proposed that foliage of *S. saman* stands out among the most promising tropical plants for reducing enteric CH<sub>4</sub> emissions. A reduction in CH<sub>4</sub> emissions by dairy steers was observed by Anantasook et al. (2014) when *S. saman* pods were supplemented at 60 g/kg DMI in 60:40 and 40:60 roughage: concentrate ratios, with reductions of 8.25 and 9.25% respectively. Content of secondary metabolites in the pods of *S. saman* can affect the process of CH<sub>4</sub> synthesis in the rumen. Condensed tannins found in *S. saman* pods suppress the production of methane (Anantasook and Wanapat, 2012) by increasing propionate synthesis, while reducing the availability of metabolic hydrogen needed by *archaea* as a donor for the reduction of CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub>. Saponins also have an effect on rumen fermentation pattern, and in many cases efficiency is increased since the acetic: propionic ratio is reduced without affecting the degradability of the ration compounds. These changes in the fermentation pattern improve the productivity of the animal (Goel et al., 2008). Wang et al. (2012) found that the addition of saponins (3 g/day) improved daily weight gains and feed efficiency in goats due to the increase in duodenal protein flow and reduced ammonium concentrations in the rumen (Rochfort et al., 2008). Albores-Moreno et al. (2017) observed that the incorporation of ground pods of *E. cyclocarpum* as source of saponins increased the molar proportion of propionic acid in rumen liquor and a concomitant 36% reduction in CH<sub>4</sub> emissions by Pelibuey sheep. Mao et al. (2010) included 3 g of saponins per day in sheep rations and decreased methane production in the rumen by 27%. It has also been pointed out that steroidal saponins may reduce methane production in the rumen by using alternative pathways. Hess et al. (2003) found that the tropical fruit *Sapindus saponaria* reduced methane production in faunated and defaunated rumens by 14 and 29% respectively, showing that the effect depended not only on the reduction in protozoa population, but also on the possible effect of carbohydrate fermentation and digestibility in the whole tract. Guo et al. (2008) observed a reduction in the enzymatic activity of methanogenic archaea by the effect of inclusion of saponins. Furthermore, it is also known that saponins favour the production of propionic acid in the rumen as observed in this work, where a 23% increase in propionate was recorded, resulting in a lower availability of hydrogen molecules required for the reduction of CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub> (Patra et al., 2017). In this study, an increase in the proportions of propionic and butyric acids in the rumen was found, while acetic acid and acetic: propionic ratio were reduced with increasing levels of *S.*

*saman*. It is likely that the population of *propionibacterium* in the rumen increased and the population of cellulolytic bacteria was therefore decreased. Consequently, reducing the digestibility of fiber, CH<sub>4</sub> synthesis and increasing propionic acid. The inclusion of *S. saman* pod meal improved the quality of the ration by increasing the amount of CP and GE intake, generating an increase in the molar proportion of propionic acid consequently reducing CH<sub>4</sub> emissions up to 50%.

Other components of the *S. saman* pods such as total starch (180.1 g/kg DM) could have changed fermentation pattern and consequently reduce methane production. Cereal grain diets rich in starch content increase the proportion of propionic acid. Hosamani et al. (2005) pointed out that the chemical composition of *S. saman* pods is equivalent to any cereal grain byproducts like deoiled rice.

Rumen pH values were optimal for appropriate rumen function. The readily degradable fraction (62.4%) of *S. saman* pods can reduce physical fill of the rumen, reducing methane emissions due to an increase in DMI. As the *S. saman* pod content in the ration is increased, the readily degradable fraction also increases, resulting in a quick fermentation of the material consumed and reduced retention time of the digesta in the rumen. Piñeiro-Vázquez et al. (2013) found an increase DMI in Pelibuey lambs as the amount of *E. cyclocarpum* pods increased in the diet due to the higher content of the readily degradable fraction.

It is important to point out that reduction in the methane emission factor (L CH<sub>4</sub>/kg DM intake) when cattle are fed ground pods of *S. saman*, demonstrates the high potential of this tropical resource to mitigate methane emissions under practical farming conditions in developing countries. The relatively high (~80%) rumen degradability of dry matter of *S. saman*, also stresses its potential to increase intake and animal production at farm level.

As far as the authors are concerned this is the first report in which the potential of *S. saman* for enteric methane mitigation is evaluated under in vivo conditions with cattle housed in respiration chambers. The observed change in the molar proportions of volatile fatty acids in the rumen when *S. saman* pods are fed, is conducive towards an improvement in the efficiency of the absorbed

metabolizable energy for growth ( $k_f$ ) (Blaxter, 1989) which may lead to better animal performance. Feed trials using this tropical resource are required to provide more evidence.

## **5. Conclusion**

This study suggests that the incorporation of ground pods of *S. saman* in the ration induces a linear reduction in the emissions of enteric CH<sub>4</sub> as percentage inclusion increased from 10 to 30% of dry matter intake in heifers fed chopped *P. purpureum* grass.

## **Conflict of interest**

We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

## **Acknowledgements**

The author is indebted to CONACYT-Mexico for granting an MSc scholarship at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Yucatan, Merida, Mexico.

## **Funding**

We thank the Molina Center for Energy and the Environment (La Jolla, CA, USA) for financial support to keep the respiration chambers running and to CINVESTAV-IPN-Merida for supplying high purity methane for calibration of the chambers and reference methane cylinders for calibration of the methane analyser. We are indebted to the Dairy Unit at FMVZ-UADY for lending the experimental heifers.

## **References**

Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J.A., Ayala-Burgos, A.J., Solorio-Sánchez, F.J., Aguilar-Pérez, C. F., Olivera-Castillo, L., Ku-Vera, J.C., 2017. Effects of feeding ground pods of *Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb on dry matter intake, rumen fermentation, and enteric methane production by Pelibuey sheep fed tropical grass. *Trop. Anim. health Prod.* 49, 857-866.

- Anantasook, N., Wanapat, M., 2012. Influence of rain tree pod meal supplementation on rice straw based diets using in vitro gas fermentation technique. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25, 325–334. doi:10.5713/ajas.2011.11131.
- Anantasook, N., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Manipulation of ruminal fermentation and methane production by supplementation of rain tree pod meal containing tannins and saponins in growing dairy steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 98, 50–55. doi:10.1111/jpn.12029.
- Anantasook, N., Wanapat, M., Cherdthong, A., Gunun, P., 2015. Effect of tannins and saponins in *Samanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 99, 335–344. doi:10.1111/jpn.12198
- AOAC., 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington: AOAC International.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P., Doreau, M., 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and Legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167, 59–64.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Martinez, T.F., McAllister, T.A., 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 1990-1996.
- Bhatta, R., Enishi, O., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Takusari, N., Higuchi, K., Tajima, K., Takenaka, A., Kurihara, M., 2013. Methane reduction and energy partitioning in goats fed two concentrations of tannin from mimosa spp. *J Agric Sci.* 151, 119–128. doi: 10.1017/S0021859612000299.
- Blaxter, K., 1989. Energy metabolism in animals and man. CUP Archive.
- Brouwer, E., 1965. Report of subcommittee on constants and factors, in: Blaxter, K.L. (Ed.), *Energy Metabolism of Farm Animals Third Symposium on Energy Metabolism*. Academic Press, London, pp. 441–443.
- Canul-Solis, J.R., Piñeiro-Vázquez, A.T., Arceo-Castillo, J., Alayón-Gamboa, J.A., Ayala-Burgos, A.J., Aguilar-Pérez, C.F, Solorio-Sánchez, F.J., Castelán-Ortega, O.A., Lachica-López, M., Quintana-Owen, P., Ku-Vera, J.C., 2017. Design and construction of low-cost respiration chambers for ruminal methane measurements in ruminants. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8, 185-191.

Cochran, W.G., Cox, G.M., 1991. Diseños Experimentales. 2nd ed. Trillas, Mexico.

Delgado, D., Hera, R., Cairo, J., Orta, Y., 2014. *Samanea saman*, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo. Rev. Cuba. Cienc. Agrícola. 48, 205–213.

FAO., 2011. How to feed the world in 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. [En línea] Disponible en: URL [www.fao.org/fileadmin/.../wsfs/.../How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/.../wsfs/.../How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf).

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2003: Manual on the Production and Use of Live Food for Agriculture, Worksheet 2.2.: Determination of cell concentrations using haemocytometer according to Fuchs Rosenthal and Burker. Rome, Italy.

Galindo, J., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A.I., Achang, G., Moreira, O., Sarduy, L., Noda, A.C., 2014. Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and in vitro ruminal protozoa population Rev. Cuba. Cienc. Agric. 48, 359–364.

Galindo, J., González, N., Scull, I., Marrero, Y., Sosa, A., Aldana, A.I., Moreira, O., Delgado, D., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., O La, O., Sarduy, L., Noda, A., Achang, O., 2012. Efecto de *Samanea saman* (Jacq.) Merr., *Albizia lebbek* (L.) Benth y *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (material vegetal 23) en la población de metanógenos y en la ecología microbiana ruminal. Rev. Cuba. Cienc. Agric. 46, 273–278.

García, E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía, UNAM.

Gardiner, T.D., Coleman, M.D., Innocenti, F., Tompkins, F., Connor, A., Garnsworthy, J.M., Reynolds, C.K., Waterhouse, A., Wills, D., 2015. Determination of the absolute accuracy of UK chamber facilities used in measuring methane emissions from livestock. Measurement. 66, 272–279.

Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Tempio, G., 2013. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J. Appl. Microbiol.* 105, 770–777. doi:10.1111/j.1365-2672.2008. 03818
- Goñi, I., Garcia-Diz, L., Mañas, E., Saura-Calixto, F., 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food chem.* 56, 445-449.
- 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. *Lett Appl Microbiol.* 47, 421-426.
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Díaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R., Machmüller, A., 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109, 79–94.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., van Herk, F.H., Cheng, K.J., Newbold, C.J., Cheeke, P.R., 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77, 2554-2563.
- Ivan, M., Koenig, K.M., Teferedegne, B., Newbold, C.J., Entz, T., Rode, L.M., Ibrahim, M., 2004. Effects of the dietary *Enterolobium cyclocarpum* foliage on the population dynamics of rumen ciliate protozoa in sheep. *Small. Rumin. Res.* 52, 81-91.
- Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C.R., 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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 163, 231-243.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci.* 73, 2483–92.
- Kerem, Z., German-Shashoua, H., Yarden, O., 2005. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L). *J. Sci. Food Agric.* 85, 406–412. doi:10.1002/jsfa.1989
- 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, 3231–61.

- Machado, F.S., Tomich, T.R., Ferreira, A.L., Cavalcanti, L.F.L., Campos, M.M., Paiva, C.A.V., Ribas, M.N. and Pereira, L.G.R., 2016. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle, J. Dairy Sci. 99,4899–4906.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., 1993. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. J. Chem. Ecol. 19, 613–621. doi:10.1007/BF00984996
- Makkar, H.P.S., Becker, K., 1997. Degradation of *Quillaja saponins* by mixed culture of rumen microbes. Lett Appl Microbiol. 25:243-245.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Becker, K., 1995. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen - Makkar - 2006 - Journal of the Science of Food and Agriculture - Wiley Online Library.
- Mao, H.L., Wang, J.K., Zhou, Y.Y., Liu, J.X., 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. Livest. Sci. 129, 56-62.
- Newbold, C.J., el Hassan, S.M., Wang, J., Ortega, M.E., Wallace, R.J., 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. Br. J. Nutr. 78, 237–249. doi:10.1079/bjn19970143
- NRC., 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7 edition. Washington: Natl Acad Sci.
- Ogimoto, K., Imai, S., 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Ørskov E.R., McDonald I., 1979. The estimation of the protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. (Cambridge). 92, 449–503.
- Ørskov, E.R., 2000. The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.), Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 175–188.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. J. Anim. Sci. Biotech. 8(1), 13.

- Pinares-Patiño, C.; Garry, W., 2012. Technical Manual on Respiration Chamber Designs. Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington, New Zealand. ISBN 978-0-478-38788-9 (online)
- Pineiro-Vazquez, A.T., Ayala-Burgos, A.J., Chay-Canul, A.J., Ku-Vera, J.C., 2013: Dry matter intake and digestibility of rations replacing concentrates with graded levels of *Enterolobium cyclocarpum* in Pelibuey lambs. Trop. Anim. Health. Prod. 45, 577-583.
- Poppi, D.P., McLennan, S.R., 1995. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. J Anim Sci. 73, 278-290.
- Ramírez-Restrepo, C.A.; Tan, C.; O'Neill, C.J.; López-Villalobos, N.; Padmanabha, J.; Wang, J.; McSweeney, C.S., 2016: Methane production, fermentation characteristics, and microbial profiles in the rumen of tropical cattle fed tea seed saponin supplementation. Anim. Feed Sci. Technol. 216, 58-67.
- Ramos-Morales, E., Arco-Pérez, A., Martín-García, A. I., Yáñez-Ruiz, D. R., Frutos, P., Hervás, G., 2014. Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulation to study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. Anim. Feed. Sci. Tech. 198, 57-66.
- Rochfort, S., Parker, A. J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. Phytochemistry. 69, 299-322.
- Rosales, M., Laredo, M., Cuesta, A., Anzola, H., Hernández, L., 1989: Use of tree foliages in the control of rumen protozoa. Livest. Res. Rural Develop. 1, 78-84.
- Ryan, J.P., 1980. Determination of volatile fatty acids and some related compounds in ovine rumen fluid, urine and blood plasma by gas-liquid chromatography. Anal. Biochem. 108, 374-384.
- SAS Institute., 2006. SAS/STAT Software, Version 9.00. SAS, Cary, NC
- Schneider, B.H., Flatt, W.P., 1975. The evaluation of feeds through digestibility experiments. University of Georgia Press.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). 2015. Consulted March 3rd, 2017 in: <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/165997/bovino.pdf>



Valencia, E.F, Mac Donald, D., Cuyos, M.R.S., Ancona, D.A.B, Ruelas, A.F.C., 2005. Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. Biotempo. 5, 31-36.

Wang, Y.X., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Cheeke, P.R., Cheng, K.J., 1997. Effects of Yucca Extract on Fermentation and Degradation of Saponins in the Rusitec. Proceedings of Western Section, American Society of Animal Science, Vol. 48. Nashville, Tennessee, USA. 49-152.