



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**USO DEL FRUTO DE *Enterolobium cyclocarpum*
COMO FUENTE DE SAPONINAS ESTEROIDALES
PARA REDUCIR LA PRODUCCIÓN DE METANO
ENTÉRICO EN BOVINOS.**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

Médico Veterinario Zootecnista

Freddy de Jesús Lazos Balbuena

Asesores:

Dr. Juan Carlos Ku Vera

Dr. Francisco Javier Solorio Sánchez

Mérida, Yucatán, México, septiembre del 2016

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.

MVZ. Freddy de Jesús Lazos Balbuena

DEDICATORIA

A Dios por permitirme lograr una meta más en mi vida.

A mi padre Isaac Efrén Lazos Coutiño y a mi madre Martha Balbuena Gómez por el amor, el apoyo y la confianza que depositaron en mis capacidades para realizar mis objetivos.

A mis hermanos Jorge Isaac y Carlos Alberto por el apoyo moral y los buenos consejos que siempre me han brindado.

A mi abuelita Brigida Gómez Ruíz por sus sabios consejos y por por todo el amor que yo le tengo.

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 otorgarme la oportunidad de realizar las actividades académicas necesarias para culminar con los estudios de Maestría en Ciencias.

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

A mis asesores, Dr. Juan Carlos Ku Vera y Dr. Francisco Javier Solorio Sánchez por guiarme correctamente a lo largo de mi formación como estudiante de Maestría y por todos los buenos consejos.

A mis tutores, Dr. Carlos Fernando Aguilar Pérez y Dr. Arturo Castellanos Ruelas por todos los acertados comentarios y sugerencias para bien de esta tesis de Maestría.

A todos los buenos amigos que estuvieron para apoyarme a lo largo de este proceso.

A mi novia Claudia por la paciencia, el apoyo, el interés y todo el amor que me brindó en este proceso.

A los trabajadores de los corrales de nutrición por brindarme tan importante apoyo en el trabajo experimental.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con el fruto de *Enterolobium cyclocarpum* sobre el consumo, la digestibilidad y la producción de metano entérico en vaquillas alimentadas con una dieta base de pasto *Pennisetum purpureum*. Cuatro vaquillas cruzadas (*Bos indicus* × *Bos taurus*) con un peso vivo promedio de 313.94 ± 20 kg fueron asignadas al azar para recibir tratamientos en la dieta acorde a un diseño experimental Cuadrado Latino 4 × 4. Se emplearon cuatro tratamientos: sin suplementación (solo pasto *P. purpureum*) y niveles crecientes de suplementación (12, 24 y 36% en base seca) del fruto molido de *E. cyclocarpum* dentro de la dieta. El *E. cyclocarpum* contiene 29 g de saponinas esteroideas/kg de materia seca (MS). La producción de metano (CH₄) fue medida usando dos cámaras de respiración de circuito abierto y un analizador infrarrojo de metano. Se observó que al suplementar con *E. cyclocarpum* a las vaquillas no causó un efecto negativo sobre el pH ruminal ($p < 0.05$). En este sentido, la suplementación resultó en un incremento en el consumo de MS y en una mejora en la digestibilidad aparente de la materia orgánica (MO) ($p < 0.05$). La producción de metano expresada en L de CH₄/kg de materia seca digestible consumida (CMSD) fue un 34.4% menor en los tratamientos con 24 y 36% de suplementación respecto a la dieta testigo ($p < 0.05$). Además, se encontró que los protozoarios ciliados fueron sensibles a la presencia de las saponinas del *E. cyclocarpum* en el rumen ($p < 0.05$). Los resultados del presente estudio mostraron que la suplementación con el fruto molido de *E. cyclocarpum* a vaquillas alimentadas con una dieta base de *P. purpureum* mejoró el consumo voluntario y la digestibilidad aparente de la ración disminuyendo la producción de metano.

Palabras clave: Saponinas, consumo voluntario, digestibilidad, metano, protozoarios, ganado.

SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the effect of the supplementation with *Enterolobium cyclocarpum* on feed intake, digestibility and enteric methane production in heifers fed with a low quality grass (*Pennisetum purpureum*) as basal diet. Four crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) with an average live weight of 313.94 ± 20 kg were randomly assigned to receive dietary treatments according to a 4×4 Latin square design. Four treatments were employed: control diet (CON; 0% of supplementation) and increasing levels of supplementation (12, 24 and 36% dry basis) with ground pods of *E. cyclocarpum* into the diet. *E. cyclocarpum* contained steroidal saponins at 29 g/kg of dry matter (DM). Methane production was measured using two open-circuit respiration chambers and an infrared methane analyzer. It was observed that supplementation with *E. cyclocarpum* to crossbred heifers did not show a negative effect on ruminal pH ($p < 0.05$). In this sense, supplementation resulted in higher DM intake and an improvement in apparent digestibility of organic matter (OM) ($p < 0.05$). In addition, methane (CH₄) production decreased by 34.4% ($p < 0.05$) when it was expressed as L of CH₄/kg of digestible dry matter intake (DDMI) with *E. cyclocarpum* supplementation at 24 and 36% compared to CON diet. Furthermore, it was found that protozoa were sensitive to the presence of steroidal saponins from *E. cyclocarpum* ($p < 0.05$). The findings on the present study showed that supplementation with ground fruit of *E. cyclocarpum* into the diet of heifers improved voluntary intake and apparent digestibility and decrease methane production.

Keywords: Saponins, intake, digestibility, methane, protozoa, cattle.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| CAPÍTULO II | 3 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Emisiones de metano..... | 3 |
| 2.2 Metano entérico y metanogénesis ruminal..... | 4 |
| 2.2.1 Formación de metano en el rumen (metanogénesis ruminal)..... | 6 |
| 2.3 Las saponinas como metabolito secundario de las plantas con efecto sobre la producción de metano entérico..... | 7 |
| 2.4 <i>Enterolobium cyclocarpum</i> : generalidades..... | 9 |
| 2.4.1 Usos del <i>Enterolobium cyclocarpum</i> en la dieta de rumiantes..... | 10 |
| 2.5 Referencias..... | 14 |
| CAPÍTULO III | 23 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 23 |
| CAPÍTULO IV | 24 |
| ARTÍCULO CIENTÍFICO | 24 |
| Effect of increasing levels of supplementation with ground pods of <i>Enterolobium cyclocarpum</i> on methane emissions in heifers fed a low-quality grass | 25 |
| Summary..... | 25 |
| Introduction..... | 26 |
| Materials and methods..... | 27 |
| Results..... | 31 |
| Discussion..... | 34 |
| Conclusion..... | 37 |
| References..... | 38 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Estimativos de las principales fuentes naturales y antropogénicas de metano a nivel global (millones de ton. /Año)..... | 3 |
| Table 1. Chemical composition of <i>E. cyclocarpum</i> , <i>P. purpureum</i> and soybean meal..... | 28 |
| Table 2. Intake and apparent digestibility in heifers fed with increasing levels of <i>E. cyclocarpum</i> | 32 |
| Table 3. Methane production in heifers fed with <i>P. purpureum</i> and increasing levels of <i>E. cyclocarpum</i> | 33 |
| Table 4. pH and protozoa population in ruminal liquor of heifers supplemented with <i>E. cyclocarpum</i> | 34 |

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

El aumento constante de la población humana tanto en la mayoría de los países en vías de desarrollo como en algunos países desarrollados y el aumento en el poder adquisitivo de algunos sectores de la sociedad provocarán un aumento en la demanda de carne y leche. La FAO (2011) estimó que para el año 2050 la población mundial será de 9 mil millones de habitantes con una demanda de carne y leche que llegará a los 465 millones y a los 1000 millones de toneladas anuales respectivamente.

La producción de carne y leche bovina en las regiones tropicales de México se caracteriza por ser de tipo extensiva. La alimentación de los rumiantes en estos sistemas se basa en el pastoreo de gramíneas nativas e introducidas, las cuales se caracterizan por ser de baja calidad nutricional (bajo contenido de proteína cruda, alto contenido de fibra detergente neutra y baja digestibilidad), resultando en un baja productividad y altas emisiones de metano (CH_4) (Ellis et al., 2009). El protocolo de Kioto considera al CH_4 como el segundo gas con efecto invernadero (GEI) con más potencial de calentamiento global (21-25 veces más que el dióxido de carbono [CO_2]). En este sentido, el CH_4 proveniente de la fermentación entérica es considerado como la mayor fuente de este gas proveniente de las actividades agropecuarias (EPA, 2006; IPCC, 2014). A nivel global, la crianza de rumiantes produce ~80 millones de toneladas de CH_4 al año, de los cuales se estima que 58 millones de toneladas (73%) son producidas por el ganado bovino (Johnson and Johnson, 1995; Kurihara et al., 1999; Beauchemin et al., 2009). El CH_4 ruminal es un subproducto del proceso de la fermentación microbiana anaeróbica que sufren los carbohidratos y representa una pérdida del 2-12% del total de energía bruta consumida, dependiendo del consumo y composición química de la dieta principalmente (Beauchemin et al., 2008; Flachowsky y Lebzien, 2012). Se ha mencionado que una reducción de un 25% de las emisiones de CH_4 en los rumiantes acompañado de otros factores nutricionales pueden resultar en un incremento de hasta 1 L de leche al día en vacas altas productoras y de hasta

75 g por día en bovinos productores de carne (Waghorn et al., 1999; Min et al., 2006; Beauchemin et al., 2009).

Por lo tanto, la reducción de las emisiones de CH₄ en bovinos tiene implicaciones no solo para el cuidado del ambiente sino para la eficiencia con la que los bovinos utilizan la energía química contenida en los alimentos (Jentsch et al., 2009). En este sentido, se han utilizado aditivos químicos, principalmente antibióticos como la monensina, para disminuir las emisiones de metano en rumiantes (Pereira da Fonseca et al., 2015). Por otra parte, han aumentado las investigaciones acerca del uso de recursos vegetales como una alternativa para la reducción del CH₄ entérico emitido por los rumiantes, aprovechando la gran diversidad de árboles y arbustos tropicales tales como: *Leucaena leucocephala*, *Piscidia piscipula*, *Guazuma ulmifolia*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Gliricidia sepium*, *Sapindus saponaria*; entre otros, los cuales además de su potencial en la nutrición de los rumiantes, poseen en su follaje y frutos una amplia variedad de compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios entre los cuales se encuentran: cumarinas, fenoles, taninos condensados y las saponinas (Goel y Makkar, 2012; Soltan et al., 2013; Piñeiro-Vázquez et al., 2015; Rira et al., 2015).

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Emisiones de metano.

Cerca de 500 millones de toneladas métricas por año de metano (CH₄) son liberados a la atmósfera debido a actividades antropogénicas y fenómenos naturales. A esta tasa se espera que el metano cause cerca del 15-17% del calentamiento global. Actualmente se tienen definidas las principales fuentes de metano causantes de este efecto (cuadro 1), pero el grado de incidencia y la proporción exacta de muchas de estas fuentes no son claras (Johnson y Johnson, 1995).

Cuadro 1. Estimativos de las principales fuentes naturales y antropogénicas de metano a nivel global (millones de ton. /Año) (Johnson y Johnson, 1995).

| Natural | | Energía/Desechos | | Agricultura | |
|-------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|
| Pantanos | 115 | Gas y petróleo | 50 | Cultivos de arroz | 60 |
| Océanos | 15 | Carbón mineral | 40 | Animales domésticos | 80 |
| Termitas | 20 | Carbón vegetal | 10 | Abonos orgánicos | 10 |
| Combustión | 10 | Rellenos sanitarios | 30 | Combustión | 5 |
| | | Aguas residuales | 25 | | |
| Total | 160 | | 155 | | 155 |

Las emisiones de gas CH₄ por el ganado bovino, están estimadas en 58 millones de toneladas por año, lo que representa el 73% del total de emisiones (80 millones) de todas la especies domésticas (Johnson y Johnson, 1995; Kurihara et al.,1999).

En Colombia, la proyección de emisiones de CH₄ de origen pecuario para el 2010 representó el 70% de la participación de los gases con efecto invernadero (GEI), correspondiendo a un 95% las emisiones entéricas del ganado lechero y productor de carne (Carmona et al., 2005). Las emisiones de CH₄ procedentes de la ganadería en China,

contribuyen con aproximadamente el 7.2% de la producción mundial total estimada de CH₄ (Pinares-Patiño et al., 2008). En Japón, con base en la estimación del consumo de materia seca (MS), la emisión total derivada de la fermentación entérica fue de 0.375 millones de toneladas anuales (Takahashi, 2006). En Nueva Zelanda las emisiones entéricas de CH₄ por el ganado en pastoreo son la fuente más importante de GEI generados por la agricultura, representando el 31.8 % del total de los GEI emitidos en ese país, y se menciona que existe la urgente necesidad de que los ganaderos neozelandeses tengan acceso a tecnologías que les permitan reducir estas emisiones de una manera segura y económicamente efectiva (Takenaka et al., 2007; Swainson et al., 2007; Knight et al., 2007).

En México, los estados que aportan una mayor emisión de CH₄ entérico proveniente de los rumiantes son: Veracruz, Chihuahua, Jalisco y Chiapas, debido a que cuentan con un mayor número de cabezas de ganado (INEGI, 2008); esto es consecuencia de que la ganadería constituye parte del sistema de la economía familiar y base sociocultural de los campesinos. Sin embargo, en México son pocos los estudios que se han realizado para estimar las emisiones de CH₄ entérico en los sistemas de producción pecuaria en comparación con otras naciones.

Castelán et al. (2014) estimaron que la emisión total de CH₄ producido por los 23.3 millones de cabezas de bovinos en México con el inventario realizado por el INEGI en el 2007 era aproximadamente de 2.02 Tg por año. En su análisis formaron dos grupos: el primer grupo (7.8 millones) representa al ganado vacuno del trópico y subtrópico y el segundo grupo (15.5 millones) el ganado vacuno del clima templado, en donde un animal del primer grupo produjo 319.1 g/d y en las regiones templadas 283 g/d. Esta diferencia podría explicarse por la mayor proporción de carbohidratos estructurales en los forrajes tropicales, esto quiere decir que con una mayor proporción de celulosa y hemicelulosa en los forrajes mayor será la emisión de CH₄.

2.2 Metano entérico y metanogénesis ruminal.

Los rumiantes presentan una comunidad microbiana muy diversa dentro de su rumen, la cual está constituida por un consorcio de microorganismos encargados de fermentar el alimento que ingresa al órgano y producir ácidos grasos volátiles (AGV) que son rápidamente absorbidos a través del epitelio ruminal, sirviendo como fuente de energía para

el animal hospedero. Otros productos del proceso fermentativo como el dióxido de carbono e hidrógeno no son utilizados por el rumiante, pero sirven como sustrato para una comunidad particular de microorganismos pertenecientes al dominio *Archea*, los metanógenos. Éstos producen metano como estrategia metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento (Ramírez et al., 2014).

La actividad metanogénica contribuye notablemente al sostenimiento de la fermentación ruminal, debido a que mantiene una baja concentración de H₂ que favorece a la oxidación del cofactor reducido nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), producido durante la glucólisis (Kim y Gadd, 2008) gracias a una relación sintrópica entre los microorganismos productores de H₂ y los metanógenos (Schink, 2005). Sin embargo, la metanogénesis representa una pérdida de energía para el rumiante y constituye una fuente de emisión de gases con efecto invernadero hacia la atmósfera

Este gas es uno de los que más contribuye al efecto invernadero y es responsable del 18 % del fenómeno (Moss et al., 2000; Beauchemin y McGinn 2005). Los rumiantes emiten metano hacia la atmósfera mediante el eructo y la cantidad liberada depende del volumen de alimentos consumidos y de la composición de la ración (Gil, 2004; Beauchemin y McGinn 2005).

El proceso de metanogénesis en el rumen posee ciertas particularidades, determinadas por las características fisiológicas de este órgano, que lo distingue de la formación de metano en otros hábitats (Zinder y Anguish, 1992). Las bacterias metanogénicas ruminales forman parte de un grupo de microorganismos, que llevan a cabo la degradación de los alimentos, al utilizar los productos finales de la hidrólisis de los polímeros para la formación de metano (Bryant, 1979; Demeyer y Fievez 2000). En la actualidad se llevan a cabo numerosas investigaciones que van desde el estudio de los metanógenos del rumen hasta el análisis de la producción de metano a partir de diferentes dietas (Beauchemin y McGinn 2005), todas encaminadas a encontrar vías para mitigar la producción de metano en el rumen.

El metano ruminal es producido fundamentalmente por microorganismos del rumen durante la fermentación anaeróbica de los carbohidratos solubles y carbohidratos estructurales, siendo estos últimos preponderantes en dietas basadas en forrajes (Kurihara et al., 1999).

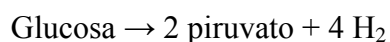
Las bacterias metanogénicas utilizan diferentes sustratos para la producción de metano, pero los principales son H₂ y CO₂. La eliminación de estos gases, principalmente del H₂ implica la remoción de un factor implicado en la estabilidad del pH ruminal siendo este esencial para una óptima fermentación (Carmona, 2005).

2.2.1 Formación de metano en el rumen (metanogénesis ruminal).

En el rumen existen principalmente tres sustratos para que la metanogénesis se lleve a cabo: CO₂, compuestos con grupo metilo y acetato. Sin embargo, los metanógenos ruminales utilizan principalmente H₂ para reducir el CO₂ a CH₄ en una serie de reacciones acopladas a la síntesis de ATP, donde el CO₂ es utilizado como fuente de carbono y el H₂ como el principal donador de electrones (Ramirez et al., 2014).

Para la formación del metano ruminal, existen dos vías metabólicas: Metanogénesis acetoclástica y Metanogénesis hidrogenotrófica (Deppenmeier et al., 1996; López et al., 1999). En este sentido, Moss et al. (2000) señalan que la estequiometría de las principales rutas de fermentación se resume de la siguiente manera:

- 1) Reacciones productora de H₂



- 2) Reacciones que utilizan H₂



Cuando el aceptor de electrones es el acetato, la vía mediante la cual se produce CH₄ es la metanogénesis acetoclástica (Ec. 1). $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ $\Delta G^\circ = -36 \text{ KJ/reacción}$. En esta vía, inicialmente el acetato es activado a acetyl-CoA por dos rutas diferentes (Deppenmeier et al., 1996) seguido de un rompimiento de los enlaces carbono-carbono y carbono-sulfuro que es catalizado por el complejo enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH). Posteriormente, el componente níquel/sulfuro de hierro del complejo, lleva a cabo la oxidación del grupo carbonilo hasta CO₂, reduciendo una ferredoxina (Fd). Mientras, el grupo metilo es transferido al componente cobalto/sulfuro de hierro y posteriormente a la coenzima M, formando CH₃-S-CoM que es dimetilado produciendo CH₄. Este último paso es catalizado por una metil reductasa (MCR) y los

electrones utilizados son derivados de átomos de sulfuro de $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ y HS-HTP con la formación de CoM-S-S-HTP . Las sustancias reducidas son transferidas a bacterias fermentadoras de carbohidratos y bacterias metanógenas. El acetato se incrementa y generalmente el propionato disminuye (Montenegro et al., 2000; Moss et al., 2000).

Cuando el aceptor de electrones es el CO_2 , se requiere al hidrógeno molecular (H_2), formiato, metanol, metilaminas, etanol o propanol como donadores de electrones (Ferry, 1992; López et al., 1999) y la vía mediante la cual se produce CH_4 es la metanogénesis hidrogenotrófica (Ec. 2). $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\Delta G^\circ = -131 \text{ KJ/reacción}$. La metanogénesis hidrogenotrófica, inicia con la activación del CO_2 a N-formilmetanofurano, que a su vez es transferido a una enzima que contiene metanopterina. Posteriormente, este intermediario es deshidratado formando metileno y dando un grupo metilo. Este grupo metilo es transferido de la metanopterina a la CoM, y mediante una última reacción (catalizada por la metil reductasa) el metil-CoM es reducido a CH_4 (Jones et al., 1987). Una diferencia notable, desde el punto de vista fisiológico entre estas dos rutas, es que la metanogénesis acetoclástica es menos lucrativa en términos energéticos que la metanogénesis hidrogenotrófica, aun cuando ambos procesos respiratorios son desasimilativos (Ferry, 1992). Por su parte, Johnson y Johnson (1995) señalan que el mayor impacto de la metanogénesis es la relación ácido acético: ácido propiónico. Si esta relación llega a 0.5, la pérdida energética puede ser de 0%. Pero, la alta concentración de ácido acético, se refleja en las pérdidas energéticas (33%). La relación acético: propiónico puede variar entre 0.9 a 4, por lo tanto las pérdidas por metano varían ampliamente.

2.3 Las saponinas como metabolito secundario de las plantas con efecto sobre la producción de metano entérico.

Las saponinas son una familia estructuralmente diversa de metabolitos secundarios de las plantas. En general, las saponinas constan de una aglicona unido a uno o más restos de azúcar. Se clasifican como saponinas de triterpeno y saponinas esteroidales basados en sus agliconas que pueden estar en la forma de triterpeno (30 átomos de C) o esteroides (27 átomos de C), respectivamente (Wina, 2012).

Algunos componentes de las plantas (saponinas, taninos o aceites esenciales) pueden afectar la metanogénesis mediante la inhibición del crecimiento, el desarrollo y la actividad

de la población de metanógenos tanto indirectamente (mediante la reducción del número de protozoarios asociados con metanógenos) como directamente, al afectar a las bacterias metanogénicas. Los metabolitos secundarios también pueden generar un cambio en la fermentación ruminal, aumentando la producción de propionato, que afecta a la metanogénesis mediante la reducción de la competencia por el hidrógeno (Cieslak et al., 2013).

Aunque las saponinas han reducido la cantidad de metano entérico hasta en un 50% en algunos estudios (Szumacher-Strabel y Cieslak, 2010; Patra y Saxena, 2010; Bodas et al., 2012), estos efectos deben ser confirmados en más estudios bajo condiciones *in vivo*. Hay una cierta ambigüedad en la literatura sobre el mecanismo de acción de las saponinas para reducir los metanógenos y la metanogénesis. Según Guo et al. (2008), la mitigación de la metanogénesis usando saponinas de té dio resultado a partir de la disminución de la actividad del gen *mcrA* (un indicador de la actividad metanogénica de la población metanógena), sin cambiar la población de metanógenos. Otros investigadores utilizaron 3g/día de saponinas de té en las dietas de ovejas y concluyeron que no hubo ningún efecto sobre las poblaciones de metanógenos (Mao et al, 2010; Zhou et al., 2011).

Investigaciones anteriores bajo condiciones *in vitro* han indicado que la mitigación del proceso de metanogénesis es posible sin una reducción en el número de metanógenos con el uso de saponinas de *Sapindus saponaria* o saponinas de té (Hess et al., 2003; Hu et al., 2005). Parece probable que la reducción de la metanogénesis está relacionada con una reducción de las arqueobacterias asociadas con protozoarios como resultado de una defaunación parcial. Una reducción en la población de protozoos disminuye la cantidad de hidrógeno disponible en el rumen para el proceso de metanogénesis (Szumacher-Strabel y Cieslak, 2010).

Las saponinas, debido a su estructura química pueden interactuar con el colesterol presente en las membranas de células eucariotas y de ese modo causar la destrucción de este tipo de células (Cheeke, 1996; Wina et al., 2005). Esto puede explicar también la falta de efecto directo de las saponinas sobre las células metanogénicas. Bodas et al. (2012) demostraron que las concentraciones bajas de saponinas influyen indirectamente en la producción de metano en el rumen mediante la reducción del número de protozoarios, mientras que las

concentraciones más altas de saponinas tienen efecto negativo directo sobre los metanógenos. Sin embargo, Canul et al. (2014) encontraron que la suplementación con 1.5, 3.0, 4.5, y 6.0 g de saponinas de *Yucca schidigera* en borregos Pelibuey no tuvo efecto sobre la producción de metano entérico.

Debido a que el rumen es un ecosistema altamente dinámico, el estudio de la influencia de los metabolitos secundarios sobre los microorganismos implicados en el proceso de metanogénesis se debe tener en cuenta a los factores que pueden desactivar las propiedades biológicas de las saponinas, incluyendo la degradación, hidrólisis, desglucosilación y la desintoxicación de saponinas (Miles et al., 1992; Makkar y Becker 1997; Odenyo et al., 1997; Teferedegne et al., 1999). De acuerdo con otros autores, la duración de la administración de saponinas y la proporción de forraje y concentrados pueden tener una influencia significativa en su efecto (Newbold et al., 1997, Teferedegne et al., 1999; Goel et al., 2008).

Es importante reportar que Hess et al. (2002), exponen que la liberación de metano se puede disminuir con el uso de frutos que contengan saponinas en su estructura química, tal es el caso del fruto de *Sapindus saponaria* que al incluirlo en dietas con pastos de baja calidad con o sin suplementación de leguminosa se puede observar una reducción del gas. Sin embargo, Abreu et al. (2003), señalan que el uso del mismo árbol en proporciones de 8% de fruto y 5% de pericarpio o 1.2% de extracto de saponinas semi purificadas (en base seca de la dieta basal) en una dieta compuesta por *Brachiaria dictyoneura* (60%) y *Cratylia argentea* (40%) no manifestó efectos sobre la disminución de las emisiones de metano. Los autores explican que aunque el efecto de los tratamientos sobre la metanogénesis no fue significativo, si se observó una reducción alta en la liberación de metano en relación con la cantidad degradada de materia seca como en la materia orgánica bajo condiciones *in vivo*, lo cual podría reflejarse en una reducción de metano emitido por unidad de proteína animal producida, que sería útil aun cuando la cantidad total de metano emitido por animal no disminuya.

2.4 *Enterolobium cyclocarpum*: generalidades.

Enterolobium cyclocarpum es una mimosoideae arbórea nativa del neotrópico americano, identificada con diferentes nombre comunes, tales como: Guanacaste, orejón, parota, pich,

entre otros. Presenta una amplia distribución geográfica, localizándose como especie secundaria en vegetación perturbada desde el centro de México (23°N) hasta el norte de América del Sur (7°N) (Francis, 1988).

Es una planta que alcanza hasta 40 m de altura, frecuentemente empleada en programas de reforestación, restauración y en sistemas agroforestales, en virtud de su amplio desarrollo radicular y su capacidad de fijación del nitrógeno; todo esto, en el marco de una abundante producción de madera, follaje y frutos (Rocha y Aguilar, 2001). Se caracteriza por una amplia adaptabilidad a diferentes condiciones agroecológicas, *E.cyclocarpum* es considerada una planta leñosa con potencial forrajero debido a su composición química y el valor nutricional de su follaje y frutos (Pinto-Ruiz et al., 2010).

Al igual que el resto de las fabáceas arbóreas, sus potencialidades nutricionales se ven limitadas en sistemas silvopastoriles por la presencia de una variada gama de metabolitos secundarios; dentro de los cuales se destacan las saponinas, taninos condensados y esteroides, entre otros (Babayemi, 2006).

El árbol del *E. cyclocarpum* tiene una corteza, la cual es de superficie lisa granulosa con abundantes lenticelas y la corteza interna con posee un exudado pegajoso, la madera se caracteriza por ser blanca con vasos grandes y parénquima vicentrico. Sus hojas contienen yemas de 1 a 2 mm agudas y se encuentran cubiertas por estípulas verde-oscúras y pubescentes. Las flores se encuentran dispuestas en cabezuelas axilares de 1.5 a 2 cm de diámetro sobre pedúnculos escasamente pubescentes. Los frutos son vainas que oscilan en tamaño de 7 a 12 cm de diámetro de una superficie semi plana y enroscadas, son de una coloración parodo obscuro brillantes de un sabor dulce con numerosas semillas en su interior. Las semillas son de forma ovoide y de una superficie aplanada de 2.5 × 1.5 cm de un color pardo obscuro con una línea particular en forma de contorno; se pueden encontrar de 10 a 17 semillas en el interior de cada vaina (Ricker et al., 1997).

2.4.1 Usos del *Enterolobium cyclocarpum* en la dieta de rumiantes.

Los sistemas de producción de rumiantes en México se caracterizan en su mayoría por ser de tipo extensivo y semi-extensivo en los cuales los animales se alimentan principalmente a través del pastoreo de gramíneas nativas e introducidas de baja a mediana calidad nutricional debido a su bajo contenido de proteína cruda (PC) y su alto contenido de

carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa). Las variaciones en la calidad de los forrajes incrementan la ingesta de material fibroso y por lo tanto, una menor productividad animal acompañada de una mayor emisión de dióxido de carbono y metano hacia la atmósfera (Kurihara et al 1999).

Por otro lado, en México en especial las regiones tropicales tanto secas como húmedas tienen un gran potencial para el desarrollo de la producción de carne y leche de origen rumiante y poder así satisfacer el mercado nacional e inclusive el internacional. Las zonas tropicales de México ocupan aproximadamente el 25% del territorio nacional (INEGI, 2004) y cuentan con abundantes recursos naturales para alimentación de los rumiantes.

En este sentido, los árboles tropicales pueden contribuir a mejorar la alimentación de los rumiantes debido a su valor nutritivo (10.86 a 25.40% de PC y 33.53 a 81.49% de degradabilidad *in situ* de la materia seca) y consecuentemente, mejorar la productividad y eficiencia en el uso de la tierra y otros recursos (Pinto-Ruíz et al., 2010).

Con base a lo mencionado anteriormente, el uso del fruto de *E. cyclocarpum* representa una alternativa viable para la alimentación de rumiantes por sus componentes nutritivos; 96.01% de materia orgánica, 12.19% de PC, 19.69% de fibra cruda, 32.51% de fibra detergente neutra y 25.56% de fibra detergente ácida (Piñeiro-Vázquez et al., 2013). Sin embargo, el fruto y el follaje del *E. cyclocarpum* como el de muchas otras leguminosas tropicales contienen metabolitos secundarios (saponinas, taninos, alcaloides, entre otros) los cuales pueden interactuar con los compuestos orgánicos de la dieta, o bien, afectar a los protozoarios y bacterias Gram positivas del rumen modificando el patrón de fermentación ruminal (Goel et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado el potencial nutritivo del fruto de *E. cyclocarpum*. Moscoso et al. (1995) evaluaron el efecto de la inclusión (0, 12, 24 y 36%) del fruto de *E. cyclocarpum* como reemplazo del grano de sorgo y semilla de algodón en la dieta de borregos en crecimiento y obtuvieron que la suplementación con *E. cyclocarpum* no tuvo un efecto claro sobre la ganancia diaria de peso y otros parámetros productivos, sin embargo se consideró como una alternativa económicamente viable para abaratar costos por concepto de alimentación debido al precio del sorgo y de la semilla de algodón. Recientemente, Piñeiro-Vázquez et al. (2013) realizaron un estudio en donde evaluaron el

efecto de incluir al fruto de *E. cyclocarpum* en la dieta de borregos en crecimiento sobre el consumo y la digestibilidad aparente de la ración y encontraron que la suplementación en niveles crecientes no afecta negativamente al consumo y a la digestibilidad de la dieta. Por otra parte, observaron que la digestibilidad *in situ* de la materia seca (MS) es alta (86.64%), esto puede explicar los valores más altos en el consumo y digestibilidad de la MS registrados en este experimento.

La suplementación con el fruto y follaje del *E. cyclocarpum* tiene implicaciones tanto productivas como ambientales debido a la importancia que se le ha venido dando a los metabolitos secundarios presentes en esta leguminosa siendo las saponinas esteroidales las más abundantes en su estructura química las cuales han sido utilizadas como agente defaunante (Ivan et al., 2004). Koenig et al. (2007) demostraron que la suplementación con 187 g de MS de follaje del *E. cyclocarpum* redujo los números de protozoarios ciliados del rumen en un 25%, incrementó el suministro de nitrógeno no amoniacal (NNA) y el N de origen bacteriano, y mejoró la eficiencia de la síntesis de proteína bacteriana. El efecto anti-protozoario del *E. cyclocarpum* es limitado debido a la corta duración en el rumen, sin embargo en este estudio se observó una reducción en los números de protozoarios ciliados de un 25%, la cual es suficiente para adquirir los efectos beneficios de una población protozoaria reducida sobre la utilización del N en la producción de rumiantes. En este sentido, hay estudios realizados bajo condiciones *in vitro* que corroboran la hipótesis que el uso de las saponinas como agentes defaunantes reduce la producción de metano en el rumen debido a la simbiosis que existe entre los metanógenos y los protozoarios (Rodríguez y Fondevila, 2012; Hess et al., 2002).

Existe poca evidencia científica bajo condiciones *in vivo* que demuestren el efecto de las saponinas del *E. cyclocarpum* como un agente capaz de reducir la metanogénesis ruminal sin afectar los parámetros productivos en bovinos. Por otro lado, la hipótesis se basa en la información obtenida de los experimentos *in vivo* realizados en otras especies de rumiantes y de los estudios *in vitro* realizados en bovinos.

Con base en lo mencionado anteriormente cabe señalar que la manipulación de la dieta de los rumiantes a través del uso de las saponinas presentes en el fruto de *Enterolobium cyclocarpum* puede considerarse una alternativa viable para disminuir la producción de

metano ruminal bajo condiciones de trópico, en donde la mayoría de los sistemas de producción se caracterizan por ser de tipo extensivo y semi extensivo y en donde los rumiantes se alimentan con dietas de baja calidad. Ya que una reducción en la producción de metano ruminal y la canalización del hidrógeno metabólico hacia los ácidos grasos de cadena corta y masa microbial, es deseable siempre y cuando estos no afecten la productividad animal.

2.5 Referencias.

- Abreu, A., Fornaguera, J. E. C., Kreuzer, M., Lascano, C. E., Díaz, T. E., Cano, A. & Hess, H.-D. 2003. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis in vitro en un sistema RUSITEC. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16, 147-154.
- Babayemi, O. J. 2006. Antinutritional factors, nutritive value and in vitro gas production of foliage and fruit of *Enterolobium cyclocarpum*. *World Journal of Zoology*, 1, 113-117.
- Beauchemin, K. A. & McGinn, S. M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science*, 83, 653-661.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 21-27.
- Beauchemin, K. A., McGinn S. M. & McAllister, T. A. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour*, 4, 1-18.
- Budan A., Tessier N., Pierre C., Guilet D., Yáñez-Ruíz D. R. & Fievez V. 2013. Effects on in vitro and in vivo dietary supplementation with saponins on rumen fermentation with particular reference to volatile fatty acids, ammonia and methane. *Advances in Animal Biosciences*, 4:2, 577.
- Bryant, M. P. 1979. Microbial methane production—theoretical aspects. *Journal of Animal Science*, 48, 193-201.
- Canul-Solis, J. R., Piñeiro-Vázquez, A. T., Briceño-Poot, E. G., Chay-Canul, A. J., Alayón-Gamboa, J. A., Ayala-Burgos, A. J., Aguilar-Pérez, C. F., Solorio-Sánchez, F. J., Castelán-Ortega, O. A. & Ku-Vera, J. C. 2014. Effect of supplementation with saponins from *Yucca schidigera* on ruminal methane production by Pelibuey sheep fed *Pennisetum purpureum* grass. *Animal Production Science*, 54, 1834-1837.
- 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.
- 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.
- Castelán-Ortega, O. A., Ku-Vera, J. C. & Estrada-Flores, J. G. 2014. Modeling methane emissions and methane inventories for cattle production systems in Mexico. *Atmósfera*, 27, 185-191.
- Cheeke, P. R. 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. *Saponins used in Food and Agriculture*. Springer.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A. & Oleszek, W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *animal*, 7, 253-265.
- Demeyer, D. & Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. 2 ed. EDP Sciences.
- Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. 1996. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Archives of Microbiology*, 165, 149-163.
- Ellis, J. L., Kebreab, E., Odongo, N. E., Beauchemin, K., McGinn, S., Nkrumah, J. D., Moore, S. S., Christopherson, R., Murdoch, G. K., McBride, B. W., Okine, E. K. & France, J. 2009. Modeling methane production from beef cattle using linear and nonlinear approaches. *J Anim Sci*, 87, 1334-45.
- EPA. 2006. Ruminant livestock. Environmental Protection Agency. United States of America. [En línea] Disponible en: URL <http://www.epa.gov/rlep/>. [Consultado Nov. 2014].
- 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. [Consultado Oct. 2014].

- Ferry, J. G. 1992. Biochemistry of methanogenesis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 27, 473-503.
- Flachowsky, G. & Lebzien, P. 2012. Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 70-77.
- Francis, J. K. 1988. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Guanacaste, earpod-tree. Rio Piedras, PR.*
- Gil, S.B. 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feedlot). Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. [En línea] Disponible en URL <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm> [Consultado Mar. 2015].
- 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.
- Goel, G. & Makkar, H. P. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop Anim Health Prod*, 44, 729-39.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E. & McSweeney, C. S. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 421-426.
- Hess, H. D., Monsalve, L. M., Carulla J. E., Lascano C. E., Díaz T.E. & Kreuzer M. 2002. In vitro evaluation of the effect of *Sapindus saponaria* on methane release and microbial populations (1.4. 1). [En línea] Disponible en URL : http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/output1_2002.pdf [Consultado Mar. 2015].
- 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.
- INEGI. 2004. Anuarios Estadísticos de los Estados, 2004. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 2004. p. 197.
- INEGI. 2008. VIII Censo agrícola, ganadero y forestal. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Banco de información INEGI-Existencias de ganado bovino. [En línea] Disponible en URL <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biinegi/?ind=3110001007> [Consultado Abr. 2015].
- IPCC. 2014. Climate change 2014: Mitigation of climate change. Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Ivan, M., Koenig, K. M., Tefere degne, 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 Ruminant Research*, 52, 81-91.
- Jentsch, W., Piatkowski, B., Schweigel, M. & Derno, M., 2009. Quantitative results for methane production of cattle in Germany. *Archiv Tierzucht* 52, 553-649.
- Johnson, K. A. & Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73, 2483-92.
- Jones, W. J., Nagle Jr, D. P. & Whitman, W. B. 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiological Reviews*, 51, 135.
- Jouany, J. P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech*, 43, 49-62.
- Kim, B. H. & Gadd, G. M. 2008. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge university press.
- Knight T. W., Molano G., Death A. F., Clark H. & Cavanagh A. 2007. Effects of BLCS supplements on methane emissions from lactating dairy cows. *Proceedings Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. New Zealand.

- Koenig, K. M., Ivan, M., Teferedegne, B. T., Morgavi, D. P., Rode, L. M., Ibrahim, I. M. & Newbold, C. J. 2007. Effect of dietary *Enterolobium cyclocarpum* on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep maintained fauna-free, with total mixed fauna or with *Entodinium caudatum* monofauna. *British Journal of Nutrition*, 98, 504-516.
- Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R. A. & McCrabb, G. J. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *Br J Nutr*, 81, 227-34.
- Lopez, S., McIntosh, F. M., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 1-9.
- Makkar, H. P. S. & Becker, K. 1997. Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Letters in applied microbiology*, 25, 243-245.
- 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.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, S. C., Holland, P. T., Smith, B. L., Lancaster, M. J. & Embling, P. P. 1992. Identification of the calcium salt of epismilagenin. beta.-D-glucuronide in the bile crystals of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* and *Panicum schinzii* toxicoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1606-1609.
- 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. *J Anim Sci*, 84, 2546-54.
- Montenegro, J., Abarca, S. P. & Steinfeld, H. 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nítrico en sistemas de producción bovina en Costa Rica. Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. 333.7414 I61 ed. CATIE, Turrialba (Costa Rica). FAO, Roma (Italia). SIDE, San José (Costa Rica).

- Moss, A. R., Jouany, J.-P. & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. 3 ed. EDP Sciences.
- Moscoso, C., Vélez, M., Flores, A. & Agudelo, N. 1995. Effects of guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb.) fruit as replacement for sorghum grain and cotton-seed meal in lamb diets. *Small Ruminant Research*, 18, 121-124.
- 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. *British Journal of Nutrition*, 78, 237-249.
- Odenyo, A. A., Osuji, P. O. & Karanfil, O. 1997. Effect of multipurpose tree (MPT) supplements on ruminal ciliate protozoa. *Animal Feed Science and Technology*, 67, 169-180.
- 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.
- Pereira da Fonseca, M., Borges, A. L. d. C. C., Reis e Silva, R., Lage, H. F., Ferreira, A. L., Lopes, F. C. F., Pancoti, C. G. & Rodrigues, J. A. S. 2015. Intake, apparent digestibility, and methane emission in bulls receiving a feed supplement of monensin, virginiamycin, or a combination. *Animal Production Science*.
- Pinares-Patiño, C. S., Clark, H., Waghorn, G., Hunt, C., Martin, R., Lovejoy, P. & West, J. 2008. *Ruminant Methane: Extension of the Animal Calorimetry Facility at AgResearch Grasslands*. Ministry of Agriculture and Forestry.
- Pinto-Ruiz, R., Hernández, D., Gómez, H., Cobos, M., Quiroga, R. & Pezo, D. 2010. Árboles forrajeros de tres regiones ganaderas de Chiapas, México: usos y características nutricionales. *Universidad y ciencia*, 26, 19-31.
- 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, 577-83.

- Piñeiro-Vázquez, A. T., Canul-Solís, J. R., Alayón-Gamboa, J. A., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Aguilar-Pérez, C. F., Solorio-Sánchez, F. J. & Ku-Vera, J. C. 2015. Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity. *Archivos de medicina veterinaria*, 47, 263-272.
- Ramírez, J. F., Posada Ochoa, S. & Noguera, R. 2014. Ruminant methanogenesis and mitigation strategies. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 9, 307-323.
- Ricker, M., Daly, D. C., Sánchez, J. F., Moreno, R. A., Muñoz, F. W., Powell, M. H., Musálem, M. A., Corea, E. & Mendieta, L. 1997. *Botánica económica en bosques tropicales: principios y métodos para su estudio y aprovechamiento*. Nitrogen Fixing Tree Association, Hawaii (EUA).
- Rira, M., Morgavi, D. P., Archimède, H., Marie-Magdeleine, C., Popova, M., Bousseboua, H. & Doreau, M. 2015. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep¹. *Journal of Animal Science*, 93.
- Rocha, O. J. & Aguilar, G. 2001. Reproductive biology of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica: a comparison between trees left in pastures and trees in continuous forest. *American Journal of Botany*, 88, 1607-1614.
- Rodríguez, R. & Fondevila, M. 2012. Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on in vitro microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 96, 762-9.
- Schink, B. 2005. *Syntrophic associations in methanogenic degradation*. Springer.
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Sallam, S. M. A., Lucas, R. C., Louvandini, H., Kreuzer, M. & Abdalla, A. L. 2013. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition*, 67, 169-184.
- Swainson N. M., Hoskin S. O., Clark H., Pinares-Patiño C. S. & Brookes I. M., 2007. Comparative methane production and yields from adult cattle, red deer and sheep.

- Proceedings Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. New Zealand.
- Szumacher-Strabel, M. & Cieślak, A. 2010. Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *J. Anim. Feed Sci*, 19, 319-337.
- Takahashi, J. 2006. Emission of GHG from livestock production in Japan. *International Congress Series*. Elsevier.1293, 13-20).
- Takenaka A., Mistumori M., Pinares-Patiño C. S., Ronimus R. & Joblin K. N. 2007. Methane and hydrogen concentrations in the breath of sheep. *Proceedings Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. New Zealand.
- Teferedegne, B., McIntosh, F., Osuji, P. O., Odenyo, A., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. 1999. Influence of foliage from different accessions of the sub-tropical leguminous tree, *Sesbania sesban*, on ruminal protozoa in Ethiopian and Scottish sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 11-20.
- Waghorn, G. C., Reed, J. D. & Ndlovu, L. R., 1999. Condensed tannins and herbivore nutrition. *Proceedings of the XVIII International Grassland Congress* 3, 153-166.
- Wina, E., Muetzel, S. & Becker, K. 2005. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8093-8105.
- Wina, E. 2012. Saponins: Effects on Rumen Microbial Ecosystem and Metabolism in the Rumen. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer.
- Zhou, Y. Y., Mao, H. L., Jiang, F., Wang, J. K., Liu, J. X. & McSweeney, C. S. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 93-100.

Zinder, S. H. & Anguish, T. 1992. Carbon monoxide, hydrogen, and formate metabolism during methanogenesis from acetate by thermophilic cultures of *Methanosarcina* and *Methanotherix* strains. *Applied and environmental microbiology*, 58, 3323-3329.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis.

La suplementación con *Enterolobium cyclocarpum* en vaquillas alimentadas con una dieta base de *Pennisetum purpureum* mejora la digestibilidad de la ración reduciendo la producción de metano entérico y la población de protozoarios ciliados.

Objetivo general.

Evaluar el efecto de la suplementación con el fruto de *Enterolobium cyclocarpum* sobre la producción de metano entérico en vaquillas alimentadas con una dieta base de pasto *Pennisetum purpureum*.

Objetivos específicos.

Evaluar el efecto de la suplementación con *Enterolobium cyclocarpum* sobre el consumo voluntario y la digestibilidad aparente de la ración.

Cuantificar la población de protozoarios ciliados en el líquido ruminal de vaquillas alimentadas con distintos niveles de *Enterolobium cyclocarpum*.

CAPÍTULO IV

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Effect of increasing levels of supplementation with ground pods of *Enterolobium cyclocarpum* on methane emissions in heifers fed a low-quality grass.

F. Lazos-Balbuena^{1*}, A.T. Piñeiro-Vázquez², A.J Ayala-Burgos¹, F.J. Solorio-Sánchez¹
and J.C. Ku-Vera¹

¹*Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Animal Nutrition Department,
University of Yucatán P.C 97300 Mérida, Yucatán, México.*

²*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP CENID
Fisiología P.C.76280 Ajuchitlán, Querétaro, México.*

*correspondence: F. Lazos-Balbuena, *Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,
Animal Nutrition Department, University of Yucatán P.C 97300 Mérida, Yucatán, México;*
Tel: +52-961-19-8-7008. E-mail:flazosb@gmail.com

**Artículo científico preparado acorde a las instrucciones de la revista *Journal of
Animal Physiology and Animal Nutrition.***

Effect of increasing levels of supplementation with ground pods of *Enterolobium cyclocarpum* on methane emissions in heifers fed a low-quality grass.

F. Lazos-Balbuena^{1*}, A.T. Piñeiro-Vázquez², A.J Ayala-Burgos¹, F.J. Solorio-Sánchez¹
and J.C. Ku-Vera¹

¹*Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Animal Nutrition Department,
University of Yucatán P.C 97300 Mérida, Yucatán, México.*

²*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP CENID
Fisiología P.C.76280 Ajuchitlán, Querétaro, México.*

*correspondence: F. Lazos-Balbuena, *Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,
Animal Nutrition Department, University of Yucatán P.C 97300 Mérida, Yucatán, México;*
Tel: +52-961-19-8-7008. E-mail:flazosb@gmail.com

Summary

The aim of this research was to evaluate the effect of the supplementation with *Enterolobium cyclocarpum* on feed intake, digestibility and enteric methane production in heifers fed with a low quality grass (*Pennisetum purpureum*) as basal diet. Four crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) with an average live weight of 313.94 ± 20 kg were randomly assigned to receive dietary treatments according to a 4 × 4 Latin square design. Four treatments were employed: control diet (CON; 0% of supplementation) and increasing levels of supplementation (12, 24 and 36% dry basis) with ground pods of *E. cyclocarpum* into the diet. *E. cyclocarpum* contained steroidal saponins at 29 g/kg of dry matter (DM). Methane production was measured using two open-circuit respiration chambers and an infrared methane analyzer. It was observed that supplementation with *E. cyclocarpum* to crossbred heifers did not show a negative effect on ruminal pH ($p < 0.05$). In this sense, supplementation resulted in higher DM intake and an improvement in apparent digestibility of organic matter (OM) ($p < 0.05$). In addition, methane (CH₄) production decreased by 34.4% ($p < 0.05$) when it was expressed as L of CH₄/kg of digestible dry matter intake (DDMI) with *E. cyclocarpum* supplementation at 24 and 36% compared to CON diet.

Furthermore, it was found that protozoa were sensitive to the presence of steroidal saponins from *E. cyclocarpum* ($p < 0.05$). The findings on the present study showed that supplementation with ground fruit of *E. cyclocarpum* into the diet of heifers improved voluntary intake and apparent digestibility and decrease methane production. Therefore, supplementation with ground pods of *E. cyclocarpum* in cattle fed with low-quality grasses is recommended to productive and environmental issues.

Keywords: Saponins, intake, digestibility, methane, protozoa, cattle.

Introduction

The steady increase in human population both in developing as developed countries and the increase in the purchasing power of some sectors of society, will lead to an increase in demand for meat and milk. FAO (2011) estimating that by 2050 the world population will be 9 billion people and the demand for meat and milk will reach 465 million to 1000 million tons per year respectively.

Meat and milk production by cattle in tropical regions of Mexico is usually extensive with large land areas dedicated to the cultivation of grasses from medium to low-quality. Ruminant feeding in those systems is based on grazing of native and introduced grasses with a low nutritional quality (low content of crude protein, high content of neutral detergent fiber and low digestibility), resulting in low productivity and high methane (CH₄) emissions (Ellis et al., 2009). The Kyoto Protocol considers CH₄ as the second greenhouse gas (GHG) global warming potential (21-25 times more than carbon dioxide [CO₂]). In this sense, the CH₄ from enteric fermentation is considered as the largest source of this gas from agricultural activities (EPA, 2006; IPCC, 2014). Globally, ruminant production produces ~ 80 million tons of CH₄ per year, which an estimated 58 million tons (73%) are produced by cattle (Johnson and Johnson, 1995; Kurihara et al., 1999; Bauchemin et al., 2009).

Methane is a byproduct of the anaerobic microbial fermentation suffering carbohydrates in the rumen and it represents a loss of 2-12% of the gross energy consumed by animal depending of intake and dietary chemical composition (Bauchemin et al., 2008;

Flachowsky and Lebzien, 2012). It has been mentioned that a reduction of 25% of CH₄ emissions in ruminants accompanied by other nutritional factors may result in an increase of up to 1 L of milk per day in daily cows and up to 75 g per day in beef cattle (Waghorn et al., 1999; Min et al., 2006; Beauchemin et al., 2009).

Reducing CH₄ emissions in cattle has implications on environmental issues and efficient use of the chemical energy contained in food (Jentsch et al., 2009). In tropical and desert areas of the world, there are trees and shrubs that contain a variety of secondary metabolites that may contribute toward decreasing methane emissions in ruminants (Goel and Makkar, 2012; Soltan et al., 2013; Piñeiro-Vázquez et al., 2015; Rira et al., 2015). In fact, *Enterolobium cyclocarpum* is a legume that contains ~ 4% of steroidal saponins into its chemical structure (Rodriguez and Fondevila, 2012). Saponins, for their chemical structure can interact with cholesterol in eukaryotic membrane cells and cause lysis of protozoa and methanogens (Mao et al., 2010).

The aim of this research was to evaluate the effect of the supplementation with ground pods of *E. cyclocarpum* on enteric methane production in heifers fed with a low-quality grass (*Pennisetum purpureum*) as basal diet.

Materials and methods

Location

The trial was carried out at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Yucatan in Merida (20°57'57''N, 89°37'23''O), México. Climate in the region is warm tropical with an average annual precipitation of 953 mm and average annual temperature of 29.5 °C ranging between 38 °C maximum and 22.3 °C minimum (INEGI, 2015).

Animals, experimental design and treatments

Four crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) with an average live weight of 313.94 ± 20 kg were used in a 4 x 4 Latin square experimental design. Each period lasted 18 days

(12 days for adaptation to rations and management and 6 days to measurements). Heifers were fed with a basal diet of chopped Taiwan grass and 100 g of sugarcane molasses. Four treatments were employed to incorporate 0, 12, 24 and 36% dry basis of ground pods (*E. cyclocarpum*) into the ration. Control diet (CON; 0% of supplementation) received 180 g of soybean meal to balance CP requirement for maintenance as suggested by NRC (2001). Chemical composition of food was determined by laboratory analysis (Table 1).

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets.

| Ingredients (% of DM) | | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------|------------|------------|
| Treatments | <i>E. cyclocarpum</i> | <i>P. purpureum</i> | Soybean meal | Molasses | | |
| CON diet | 0.00 | 96.66 | 2.20 | 1.14 | | |
| 12% of Sup | 12.00 | 86.95 | 0.00 | 1.05 | | |
| 24% of Sup | 24.00 | 75.00 | 0.00 | 1.00 | | |
| 36% of Sup | 36.00 | 63.00 | 0.00 | 1.00 | | |
| Chemical composition (% of DM) | | | | | | |
| Component | DM (%) | OM | CP | NDF | ADF | SAP |
| <i>E. cyclocarpum</i> | 88.06 | 89.04 | 12.58 | 24.51 | 19.34 | 2.90 |
| <i>P. purpureum</i> | 33.76 | 94.25 | 6.33 | 68.05 | 43.58 | ND |
| Soybean meal | 91.56 | 93.76 | 39.86 | 15.29 | 13.82 | ND |
| Molasses | 80.63 | 88.81 | 3.14 | ND | ND | ND |

DM: Dry matter; OM: Organic matter; CP: Crude protein; NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber; SAP: Saponins. ND: Not determined.

Animals and diet management

Heifers were housed in individual metabolic crates and into open-circuit respiration chambers to measure response variables. Before to start the trial, heifers were dewormed with Dectomax® (1 ml for each 50 kg live weight) and an intramuscular injection of vitamins ADE (Vigantol ADE®) was also used.

The pod of *E. cyclocarpum* was collected manually around the experimental site in April and May. The collected batch was dried in forced air oven at 60 °C for 48 h, ground in a hammer mill to a particle size ~3 mm and stored in plastic containers. Taiwan chopped grass and experimental diets were offered *ad libitum* simultaneously at 0900 h. Calculations were performed considering dry matter (DM) intake of 3% live weight per day (NRC, 2001).

Response variables

Voluntary intake and apparent digestibility

Intake of DM, CP, NDF, ADF and OM was calculated by the difference between amount of nutrient offered and amount of nutrient rejected. Heifers were fed at 0900 h allowing a refusal at least 15% of the amount offered. Feed refusals were weighted the following day.

Apparent digestibility of DM, NDF and OM was determined using method of total collection of feces (Schneider and Flatt, 1975), fecal total production was collected and weighted daily; a sample of 10% was taken and pooled and frozen at -20 °C until analysis.

Values of digestible OM in DM were used for metabolizable energy (ME) determination (MJ kg⁻¹DM) using the following formula suggested by McDonald et al. (2002): DOMDM= (OM intake – OM excreted in feces/DM intake) × 100; ME= 0.16 × DOMDM (g kg⁻¹ DM).

Methane production

Methane production was measured using two open-circuit respiration chambers (Pinares-Patiño and Garry, 2012) with an internal volume of 9.38 m³. Air inside of the chamber was extract by mass flow generators (50-500 L/min), which generated a negative pressure of 413.69 Pa. Following, gasses were conducted to infrared methane analyzer (MA-10 Sable System Inc. Las Vegas, USA). Heifers remained inside the chamber 23 h per day for 3 consecutive days with 23 °C and 55% of temperature and relative humidity respectively. Data were extrapolated to 24 h using ExpeData® software (MA-10 Sable System Inc. Las

Vegas, USA). The infrared analyzer was calibrated at the beginning of each sampling period using pure nitrogen (zero gas) and four known concentrations (1000, 2500, 5000 and 7500 ppm) of CH₄ diluted in nitrogen (span gas), the analyzer responded linearly to known concentrations of CH₄ with a coefficient of determination of 0.9993. Respiration chambers were calibrated by releasing analytical-grade CH₄ into the chambers to determine the recovery of CH₄. The recovery percentage of CH₄ fluctuated between 97-103%. This is comparable to recovery rates obtained at other laboratories (Zhao et al., 2016).

Protozoa population and pH in ruminal liquor

In order to determine changes in ciliated protozoa population, a sample of ruminal liquor (30 ml) on days 1 and 6 of the sampling period at 6 postprandial was taken. Protozoa count was carried out following methodology proposed by Rosales (1989). One ml of rumen liquor was mixed with 1 ml of MSF (35 ml/L formaldehyde, 0.14 mM NaCl, 0.92 mM methyl green) solution, which was centrifuged at 2000 rpm for 20 min. Supernatant was removed from centrifuged sample and 1 ml of saline solution was added, an aliquot of 1 microliter was taken and introduced into modified Fuchs-Rosenthal chamber (IVD 98/79 CE) and observed under microscope (Mikon-YS100) at a magnification of 40X. The number of ciliated protozoa was reported as log₁₀ of the total number per ml of ruminal content. Following formula was used to estimate the number of protozoa per ml: number of cells per ml⁻¹ = [(n₁+n₂+n₃+n₄+n₅)/5]/(0.022)(10³)(d). Where: n₁...n₅: number of protozoa per large square and d: dilution factor (FAO, 2003). Classification of ciliated protozoa genus was carried out according to reported by Ogimoto and Imai (1981). pH in ruminal liquor was determined immediately after taking the sample with a portable potentiometer (HANNA® Instruments, Woonsocket, USA), calibrated with buffers at pH's 4, 7 and 10.

Chemical analysis

DM determination was performed by placing food and feces samples into a forced air oven at 60 °C for 48 h to constant weight (#7.007) (AOAC, 1980). Nitrogen determination was performed with a LECCO CN-2000 series 3740 instrument (LECCO, Corporation)

(#2.057) (AOAC, 1980), crude protein was obtained by $CP = N \times 6.25$. Ashes were determined by incineration in muffle furnace at 550 °C for 6 h (#923.03) (AOAC, 1980) and the content of NDF and ADF were determined by filter bag technique (for A200 and A200I), NDF method, method 6 and ADF method, method 5 (Ankom Technology) respectively. Saponins content in *E. cyclocarpum* was determined by Haemolytic micromethod test suggested by Oleszek (1990) where the diameter of hemolysis caused by substratum in triplicate blood agar after incubation at 37 °C for 24 h was measured.

Statistical analysis

Data on voluntary intake, apparent digestibility, methane production and transformed data to Log^{10} from protozoa population counts (cells/ml of ruminal liquor) were subjected to analysis of variance using the procedure of general linear models (PROC MIXED) of SAS Institute (2004) for a 4×4 latin square design. The statistical model was $Y_{ijk} = \mu + P_i + A_j + T_k + e_{ijk}$, where Y_{ijk} is the dependent variable, μ 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. Means of treatments were compared with the Tukey test; additionally, surface analysis was carried out to assess the linear, quadratic and cubic effects of the response to treatments (SAS, 2004).

Results

Voluntary intake and apparent digestibility

Dry matter, organic matter, crude protein and metabolizable energy were linearly influenced ($p < 0.05$) by supplementation levels (Table 2). The intake of NDF and ADF was statistically similar ($p > 0.05$) among treatments (Table 2), however a quadratic effect of treatments on NDF intake was observed ($p=0.033$). DM and OM intake were increased by 16.8 and 18.5% with 24 and 36% of supplementation respectively. Metabolizable intake increased linearly ($p=0.003$) by 37.5% with the highest level of supplementation. The apparent digestibility of DM and OM was linearly influenced ($p < 0.05$) by increasing levels of supplementation. Treatments had a quadratic effect ($p=0.049$) on NDF

digestibility. Apparent digestibility of DM and OM increased by 13.8% and 13.42% with 36% incorporation of ground pods of *E. cyclocarpum* relative to CON diet (0% supplementation) respectively.

Table 2. Voluntary intake and apparent digestibility in heifers supplemented with increasing levels of *E. cyclocarpum*.

| Intake (kg/day) | CON | Supplementation levels % dry basis | | | | S.E.M. | P-value | Significance | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|----------|--------|---------|--------------|-------|--|
| | | 12 | 24 | 36 | Contrast | | | | | |
| | | L | Q | C | | | | | | |
| DM | 8.647 ^a | 9.760 ^{ab} | 10.050 ^b | 10.249 ^b | 0.260 | 0.018 | 0.004 | 0.129 | 0.552 | |
| OM | 8.139 ^a | 9.221 ^{ab} | 9.513 ^b | 9.7233 ^b | 0.243 | 0.014 | 0.003 | 0.127 | 0.534 | |
| CP | 0.698 ^a | 0.714 ^b | 0.812 ^c | 0.929 ^d | 0.019 | < 0.01 | < 0.01 | 0.626 | 0.901 | |
| NDF | 6.000 ^a | 6.102 ^a | 5.754 ^a | 5.466 ^a | 0.132 | 0.069 | 0.161 | 0.033 | 0.203 | |
| ADF | 3.697 ^a | 3.977 ^a | 3.761 ^a | 3.669 ^a | 0.077 | 0.103 | 0.424 | 0.053 | 0.124 | |
| ME MJ/day | 62.411 ^a | 79.575 ^b | 81.848 ^b | 85.850 ^b | 3.424 | 0.011 | 0.003 | 0.103 | 0.319 | |
| Apparent digestibility (%) | | | | | | | | | | |
| DM | 45.196 ^a | 51.480 ^b | 51.854 ^b | 52.436 ^b | 1.005 | 0.006 | 0.002 | 0.029 | 0.222 | |
| OM | 46.869 ^a | 53.332 ^b | 53.566 ^b | 53.993 ^b | 1.218 | 0.017 | 0.007 | 0.048 | 0.283 | |
| NDF | 49.791 ^a | 54.210 ^a | 50.483 ^a | 45.886 ^a | 1.837 | 0.092 | 0.109 | 0.049 | 0.410 | |

CON: Control diet (0% of supplementation); DM: Dry matter; OM: Organic matter; CP: Crude protein; NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber; ME: Metabolizable energy. S.E.M.: Standard error of mean. Means in the same row with different letters indicate statistical difference Tukey ($P < 0.05$); L: linear contrast; Q: Quadratic contrast; C: Cubic contrast.

Methane production

Methane production expressed as CH₄ L/day, CH₄ L/kg DMI and CH₄ L/kg OMI was similar ($p > 0.05$) among treatments. However, methane production expressed as CH₄ L/MJ MEI was affected by supplementation levels; a reduction of 36.77% was observed for treatment with 36% of supplementation compared with CON diet ($p < 0.05$). Additionally, it was observed that supplementation with 12% in the ration induced a reduction by 32.41%

(Table 3). In other hand, methane production related with digestible fractions (CH₄ L/kg DDM and CH₄ L/kg DOM) was linearly affected by supplementation ($p < 0.05$). A reduction of ~34% was observed in treatments with 12, 24 and 36% of supplementation compared to the CON diet; however, there are not statistical differences between supplementation levels.

Table 3. Methane production in heifers fed with *P. purpureum* and supplementation levels of *E. cyclocarpum*.

| Methane production | CON | Supplementation levels % dry basis | | | S.E.M. | Significance | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------|--------|--------------|----------|-------|-------|
| | | 12 | 24 | 36 | | P-value | Contrast | | |
| | | (3.48 g SAP/kgDM) | (6.96 g SAP/kgDM) | (10.44 g SAP/kgDM) | | | L | Q | C |
| CH ₄ L/day | 142.149 ^a | 128.493 ^a | 131.407 ^a | 133.586 ^a | 9.074 | 0.745 | 0.595 | 0.416 | 0.684 |
| CH ₄ L/kg DMI | 16.900 ^a | 13.176 ^a | 13.142 ^a | 13.004 ^a | 1.336 | 0.213 | 0.097 | 0.228 | 0.549 |
| CH ₄ L/kg OMI | 17.975 ^a | 13.962 ^a | 13.891 ^a | 13.700 ^a | 1.404 | 0.158 | 0.085 | 0.222 | 0.541 |
| CH ₄ L/MJ MEI | 2.536 ^a | 1.643 ^b | 1.624 ^b | 1.593 ^b | 0.270 | 0.042 | 0.046 | 0.162 | 0.492 |
| Digestible fractions | | | | | | | | | |
| CH ₄ L/kg DDM | 39.306 ^a | 25.753 ^b | 25.447 ^b | 25.212 ^b | 3.937 | 0.048 | 0.042 | 0.141 | 0.482 |
| CH ₄ L/kg DOM | 40.443 ^a | 26.307 ^b | 26.002 ^b | 25.756 ^b | 4.184 | 0.047 | 0.045 | 0.148 | 0.489 |

DMI: Dry matter intake; OMI: Organic matter intake; MEI: Metabolisable energy intake; DDM: Digestible dry matter; DOM: Digestible organic matter. S.E.M.: Standard error of mean. Means in the same row with different letters indicate statistical difference Tukey ($P < 0.05$); L: linear contrast; Q: Quadratic contrast; C: Cubic contrast.

Protozoa population and pH in ruminal liquor

The pH in ruminal liquor fluctuated between 6.5 and 6.9 at day 1 and day 6 of sampling period but it was not statistically significant ($p > 0.05$) among treatments. Total protozoa population was influenced by addition of steroidal saponins from increasing levels supplementation of *E. cyclocarpum*. The trend of holotrichs, entodiniomorphs and total protozoa in ruminal liquor ($p < 0.05$) at day 1 and day 6 of sampling period was to be decreased linearly. Treatment with 12% of supplementation and CON are similar, however, it was observed a reduction in the number of ciliated protozoa when heifers consumed 240 and 360 g/kg DM of ground pods of *E. cyclocarpum*.

Table 4. pH and protozoa population of rumen liquor of heifers supplemented with *E.cyclocarpum*.

| Item | CON | Supplementation levels % dry basis | | | S.E.M. | P-value | Significance | | |
|---|--------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|--------|---------|--------------|-------|-------|
| | | 12 | 24 | 36 | | | Contrast | | |
| | | (3.48 g SAP/kgDM) | (6.96 g SAP/kgDM) | (10.44 g SAP/kgDM) | | | L | Q | C |
| Day 1 | | | | | | | | | |
| pH | 6.83 ^a | 6.95 ^a | 6.73 ^a | 6.65 ^a | 0.098 | 0.261 | 0.141 | 0.351 | 0.301 |
| Protozoa log¹⁰ (cells/ml) | | | | | | | | | |
| Holotrichs | 4.891 ^a | 4.607 ^{ab} | 4.398 ^b | 4.521 ^{ab} | 0.086 | 0.031 | 0.014 | 0.056 | 0.529 |
| Entodiniomorphs | 6.168 ^a | 5.966 ^{ab} | 5.815 ^b | 5.797 ^b | 0.069 | 0.030 | 0.006 | 0.237 | 0.796 |
| Total | 6.191 ^a | 5.989 ^{ab} | 5.833 ^b | 5.825 ^b | 0.066 | 0.023 | 0.005 | 0.193 | 0.744 |
| Day 6 | | | | | | | | | |
| pH | 6.98 ^a | 6.98 ^a | 6.75 ^a | 6.55 ^a | 0.312 | 0.740 | 0.324 | 0.759 | 0.864 |
| Protozoa log¹⁰ (cells/ml) | | | | | | | | | |
| Holotrichs | 4.835 ^a | 4.577 ^{ab} | 3.963 ^b | 4.077 ^b | 0.186 | 0.047 | 0.013 | 0.357 | 0.242 |
| Entodiniomorphs | 6.061 ^a | 5.723 ^b | 5.823 ^{ab} | 5.654 ^b | 0.057 | 0.011 | 0.004 | 0.194 | 0.033 |
| Total | 6.087 ^a | 5.764 ^b | 5.831 ^b | 5.670 ^b | 0.055 | 0.008 | 0.003 | 0.198 | 0.048 |

CON: Control diet; Holotrichs= *Isotricha* + *Dasytricha*; Entodiniomorphs= *Entodinium* + *Diplidinium* + *Polypastron* + *Eudiplodinium* + *Epidinium* + *Ophryoscolex*; S.E.M.: Standard error of mean. Means in the same row with different letters indicate statistical difference Tukey (P<0.05) L: linear contrast; Q: Quadratic contrast; C: Cubic contrast.

Discussion

Voluntary intake and apparent digestibility

The content of crude saponins (29 g/kg DM) in ground pods of *E. cyclocarpum* used in this trial was below that reported by Rodríguez and Fondevila (2011).

Dry matter and organic matter intakes were positively influenced ($p < 0.05$) by supplementation level compared with CON diet. It is often associated with an increase in nitrogen (N) supply from treatments in the rumen and passage rate. Ramírez-Restrepo et al. (2016) did not find differences in DM intake of steers with tea saponins supplementation; similarly Canul-Solis et al. (2014) did not find an increase in DM intake of Pelibuey sheep supplemented with saponins extracted from *Yucca schidigera* (1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 g/day).

In our study, the saponins supplied were from complete ground fruits (3.48, 6.96 and 10.44 g/kg DM) from *E. cyclocarpum* unlike other studies that used pure saponins or extracts. CP content in experimental diets was higher compared with CON diet and this could have favoured DM and OM intake. Foods with low protein content are eaten by ruminants in small amounts and supplementary protein could improve voluntary intake.

Apparent digestibility of DM and OM observed in this experiment disagree with data reported by Piñeiro-Vázquez et al. (2013) who observed that DM and OM digestibility was reduced by 8.97% with 50% incorporation of pods of *E. cyclocarpum* relative to control treatment (0% of *E. cyclocarpum*). This could be because the increased level of intake has a positive effect on flow rate from the rumen, causing a rapid outflow from this organ which results in a reduction of apparent digestibility. In this sense, a low digestibility of DM may have been influenced by an increment in the concentration of ADF. The improvement in apparent digestibility of DM and OM in this study may have been influenced by the higher intake of protein and energy among treatments relative to CON and similar ($p > 0.05$) NDF and ADF intakes across diets. Other studies suggested that supplementation with saponins does not affect apparent digestibility of DM or OM (Koenig et al., 2007; Goel et al., 2008; Canul-Solis et al., 2014).

Methane production

A trend was observed in methane production (CH_4 L/day, CH_4 L/kg DMI and CH_4 L/kg OMI), although it was not statistically significant ($p > 0.05$). A reduction in methane production expressed as CH_4 L/MJ MEI was observed ($p < 0.05$); this could have been due to the defaunating effect of steroidal saponins. This variable is a form to express appropriately the CH_4 production in diets non isonitrogenous and non isocaloric. Rodríguez and Fondevila (2012) found that methane production was reduced with addition of saponins from *E. cyclocarpum* under *in vitro* conditions and Anantasook et al. (2014) found a reduction in methane production using saponins and tannins from rain tree (*Samanea saman*). On the other hand, studies under *in vivo* conditions have demonstrated that tea

saponins at doses of 3g/day in defaunated and refaunated sheep had a reduction effect on methane production (Mao et al., 2010; Zhou et al., 2011).

In the current study, supplementation with saponins from *E. cyclocarpum* (3.48, 6.96 and 10.44 g/kg DM) reduced CH₄ production (L CH₄/kg DDM) by 34.48, 35.25 and 35.85% (p < 0.05) compared to CON diet, respectively. This is generally due to the antiprotozoal properties of saponins and therefore saponins from *E. cyclocarpum* have been proposed as a defaunating agent in the rumen with potential antimethanogenic properties due to the close association between methanogens and ruminal protozoa (Van Soest and Demeyer, 1996). Saponins may have a minor effect on other microbiota which results in a lower amount of available H₂ and thus in a lower reduction of CO₂ to CH₄ in the rumen. Other studies reported that saponins had no effect on methane production in cattle under *in vivo* conditions (Holtshausen et al., 2009; Ramírez-Restrepo et al., 2016). It may be due to differences in saponins source or dose level used and adaptation of methanogens and protozoa to saponins.

Other mechanism to reduce methane emissions could be the amount of NDF consumed and digested by ruminants (Archimède et al., 2014). Under conditions in which selective consumption is limited, intake of the digestible fraction of NDF is highly correlated with CH₄ production (L/day) (Pinares-Patiño et al., 2003), outlined the concept that CH₄ production is mainly a function of the amount of cell walls digested in the rumen. Intake of forages is affected by rates of digestion and passage which is related to NDF contents in the ration. In this study, the intakes of NDF were statistically similar across the treatments which are consistent with those reported by Pinares-Patiño et al. (2003). Lower CH₄ production in this experiment may be partly due to lower NDF intake in the treatment with 36% of supplementation of *E. cyclocarpum* respect to CON.

Protozoa population and pH of rumen liquor

Ruminal pH was not affected by level of supplementation with *E. cyclocarpum*; this could have been due to the same amount of NDF and ADF consumed by heifers in all diets, a rumen pH of 6.8 is considered normal. Rumen ciliated protozoa play an important role in

CH₄ formation due to endo- and ecto-symbiotic relationships with methanogens. Therefore, non defaunated heifers were used in this study to distinguish the effect of saponins from *E. cyclocarpum* on protozoa population. Several studies indicate that saponins have the capacity of reducing ciliated protozoa population in ruminants under *in vitro* (Hu et al., 2005; Guo et al., 2008) and *in vivo* conditions (Ivan et al., 2004; Zhou et al., 2011; Anantasook et al., 2014). In the present study, numbers of ciliated protozoa were reduced by the presence of saponins relative to CON diet (0 g of saponins/kg DM) but there were no differences between saponin levels (3.3, 6.6 and 9.9 g/kg DM), this effect may be due mainly to the interaction between saponins and sterols in the protozoal membrane surface damaging the protozoal structure and decreasing their activity (Wina et al., 2005). These results differ from those found by Ramírez-Restrepo et al. (2016) who did not find effect of tea seed saponins (TSS) supplementation (20 and 30 g TSS/ day) on protozoa population. On the other hand, Anantasook et al. (2014) reduced rumen protozoa population by supplementation with rain tree pod meal in growing dairy steers. The differences between effects of saponins on protozoa population may be due to the chemical structure and dosage of saponins, animal species and adaptive potential of rumen protozoa.

Conclusion

Supplementation of *E. cyclocarpum* pod meal at 120, 240 and 360 g/kg of total DM intake was beneficial for crossbred heifers fed with a low-quality grass, resulting in improvement of voluntary intake and apparent digestibility. CH₄ production was reduced by 34.4% in terms of DDMI with 24 and 36% of supplementation and this was apparently due to the antiprotozoal properties of saponins.

Acknowledgments

Authors would like to express most sincere thanks to “Kampepem” farm for experimental animals and to Department of animal nutrition, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Yucatán for laboratory and the use of research facilities.

References

- 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.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists., 1980: *Official Methods of Analysis*. 15th edn. Washington D.C., United States of America.
- Archimède, H.; Martin, C.; Periacarpin, F.; Rochette, Y.; Etienne, T.S.; Anais, C.; Doreau, M., 2014: Methane emission of Blackbelly rams consuming whole sugarcane forage compared with *Dichanthium* sp. hay. *Animal Feed Science and Technology* **190**, 30-37.
- Beauchemin, K.A.; Kreuzer, M.; O'Mara, F.; McAllister, T.A., 2008: Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**, 21-27.
- Beauchemin, K.A.; McAllister, T.A.; McGinn, S.M., 2009: Dietary mitigation methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4**, 1-18.
- Canul-Solis, J.R.; Piñeiro-Vázquez, A.T.; Briceño-Poot, E.G.; Chay-Canul, A.J.; Alayón-Gamboa, J.A.; Ayala-Burgos, A.J.; Aguilar-Pérez, C.F.; Solorio-Sánchez, F.J.; Castelán-Ortega, O.A.; Ku-Vera, J.C., 2014: Effect of supplementation with saponins from *Yucca schidigera* on ruminal methane production by Pelibuey sheep fed *Pennisetum purpureum* grass. *Animal Production Science* **54**, 1834-1837.
- Ellis, J.L.; Kebreab, E.; Odongo, N.E.; Beauchemin, K.; McGinn, S.; Nkrumah, J.D.; Moore, S.S.; Christopherson, R.; Murdoch, G.K.; McBride, B.W.; Okine, E.K.; France, J., 2009: Modeling methane production from beef cattle using linear and nonlinear approaches. *Journal of Animal Science* **87**, 1334-45.

- EPA. Environmental Protection Agency, 2006: *Ruminant livestock*. United States of America.
- 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.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2011: *How to feed the world in 2050*. Rome, Italy.
- Flachowsky, G.; Lebzien, P., 2012: Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology* **176**, 70-77.
- Goel, G.; Makkar, H.P.S.; Becker, K., 2008: Effects of Sesbania sesban and Carduus pycnocephalus leaves and Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 72-89.
- Goel, G.; Makkar, H.P., 2012: Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production* **44**, 729-39.
- Guo, Y.Q.; Liu, J.X.; Lu, Y.; Zhu, W.Y.; Denman, S.E.; McSweeney, C.S., 2008: Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **47**, 421-426.
- Holtshausen, L.; Chaves, A.V.; Beauchemin, K.A.; McGinn, S.M.; McAllister, T.A.; Odongo, N.E.; Cheeke, P.R.; Benchaar, C., 2009: Feeding saponin-containing Yucca schidigera and Quillaja saponaria to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**, 2809-2821.

- 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.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática., 2015: *Anuario estadístico del Estado de Yucatán*. México.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change, 2014: *Climate change 2014: Mitigation of climate change*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- 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 Ruminant Research* **52**, 81-91.
- Jentsch, W.; Piatkowski, B.; Schweigel, M.; Derno, M., 2009: Quantitative results for methane production of cattle in Germany. *Archiv Tierzucht* **52**, 553-649.
- Johnson, K.A.; Johnson, D.E., 1995: Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**, 2483-92.
- Koenig, K.M.; Ivan, M.; Teferedegne, B.T.; Morgavi, D.P.; Rode, L.M.; Ibrahim, I.M.; Newbold, C.J., 2007: Effect of dietary *Enterolobium cyclocarpum* on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep maintained fauna-free, with total mixed fauna or with *Entodinium caudatum* monofauna. *British Journal of Nutrition* **98**, 504-516.
- 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.
- 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.
- McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.; Morgan, C.A., 2002: *Animal Nutrition*, 6th ed. Prentice Hall, Essex, UK.

- 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.
- NRC. National Research Council., 2001: *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th Revised Edition, Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C. United States of America.
- Ogimoto, K.; Imai S., 1981: *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- Oleszek, W., 1990: Structural specificity of alfalfa (*Medicago sativa*) saponin haemolysis and its impact on two haemolysis based quantification methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **53**, 477-485.
- Pinares-Patiño, C. S.; Baumont, R.; Martin, C., 2003: Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Canadian journal of animal science* **83**, 769-777.
- Pinares-Patiño C.; Garry W., 2012: *Technical Manual on Respiration Chamber Designs*. Ministry of Agriculture and Forestry. New Zealand.
- 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. *Tropical Animal Health and Production* **45**, 577-583.
- 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. *Animal Feed Science and Technology* **216**, 58-67.

- Rira, M.; Morgavi, D.P.; Archimède, H.; Marie-Magdeleine, C. Popova, M.; Bousseboua, H.; Doreau, M., 2015: Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of Animal Science* **93**, 334-347.
- Rodriguez, R.; Fondevila, M., 2012: Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on in vitro microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition* **96**, 762-769.
- Oleszek, W., 1990: Structural specificity of alfalfa (*Medicago sativa*) saponin haemolysis and its impact on two haemolysis based quantification methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **53**, 477-485.
- Rosales, M.; Laredo, M.; Cuesta, A.; Anzola, H.; Hernández, L., 1989: Use of tree foliages in the control of rumen protozoa. *Livestock Research for Rural Development* **1**, 78-84.
- Soltan, Y.A.; Morsy, A.S.; Sallam, S.M.A.; Lucas, R.C.; Louvandini, H.; Kreuzer, M.; Abdalla, A.L., 2013: Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition* **67**, 169-184.
- SAS. Statal Analysis System., 2004: *Statistical Analysis System Users*. SAS Institute, Cary, N.C. United States of America.
- Schneider, B.H.; Flatt, W.P., 1975: *The Evaluation of Feeds through Digestibility Experiments*. The University of Georgia Press. Athens.
- Van Nevel, C.J.; Demeyer, D.I., 1996: Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment* **42**, 73-97.
- Waghorn, G.C.; Reed, J.D.; Ndlovu, L.R., 1999: Condensed tannins and herbivore nutrition. *Proceedings of the XVIII International Grassland Congress* **3**, 153-166.
- Wina, E.; Muetzel, S.; Becker, K., 2005: The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 8093-8105.

Zhao, Y.G.; O'Connell, N.E.; Yan, T., 2016: Prediction of enteric methane emissions from sheep offered fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using data measured in indirect open-circuit respiration chambers. *Journal of Animal Science* **94**, 2425-2435.

Zhou, Y.Y.; Mao, H.L.; Jiang, F.; Wang, J.K.; Liu, J.X.; McSweeney, C.S., 2011: Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology* **166-167**, 93-100.