

Producción de metano *in vitro* y características fermentativas de gramíneas forrajeras templadas y tropicales

In vitro methane production and fermentative characteristics from temperate and tropical grasses

Mayra Iliana Rivas-Martínez^{1*} ,
Mario Antonio Cobos-Peralta¹ ,
Alejandro Ley-de Coss² ,
José Ricardo Bárcena-Gama¹ ,
Sergio Segundo González-Muñoz¹ 

¹Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, CP. 56230, Montecillo, Estado de México, México.

²Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Ocozocoautla. CP. 30470. Villaflores, Chiapas, México.

*Autor de correspondencia: rivasmayra17@gmail.com

Nota científica

Recibido: 17 de junio 2022

Aceptado: 04 de febrero 2023

Como citar: Rivas-Martínez MI, Cobos-Peralta MA, Ley-de Coss A, Bárcena-Gama JR, González-Muñoz SS (2023) Producción de metano *in vitro* y características fermentativas de gramíneas forrajeras templadas y tropicales. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 10(1): e3393. DOI: 10.19136/era.a10n1.3393

RESUMEN. El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción *in vitro* de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), y variables fermentativas de gramíneas templadas y tropicales. El diseño experimental fue completamente al azar. La producción de biogás, CH₄ y CO₂ fue mayor en las gramíneas tropicales (199.20, 55.78, y 121.58 mL g materia seca (MS) comparada con las de clima templado (61.87, 26.6 y 52.9 mL g MS⁻¹), respectivamente. La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) (mmol L⁻¹) fue mayor (P < 0,05) en las gramíneas templadas. Sin embargo, la producción de ácido acético, precursor del CH₄ fue mayor en las tropicales. El pH y la población de bacterias ruminales fueron similares entre gramíneas. Conclusión: las gramíneas tropicales evaluadas incrementaron la producción de biogás por gramo de materia seca fermentada, la cantidad de ácido acético y como consecuencia también se incrementó la producción de CH₄.

Palabras clave: Fermentación entérica, ganadería climáticamente inteligente, gases efecto invernadero, ruminantes.

ABSTRACT. The objective of this research was to evaluate *in vitro* methane (CH₄) production, carbon dioxide (CO₂), and fermentative variables from template and tropical grasses: The experiment was designed as a randomized complete design, CH₄ and CO₂ were higher in tropical grasses (199.20, 55.78, and 121.58 mL g Dry matter, DM) compared template grasses (61.87, 26.6 and 52.9 mL g DM⁻¹ respectively). Volatile fatty acid production was highest (P < 0,05) from template grasses. However, acetic acid production considered a precursor to CH₄ was mayor from tropical grass. pH and total bacteria population were similar by grasses. The conclusions were: evaluated tropical grasses increased the biogas production per gram of dry matter fermented and acetic acid amount and consequently the methane production was incremented.

Key words: Enteric fermentation, climate-smart livestock, greenhouse gases, ruminants.

INTRODUCCIÓN

La producción de rumiantes en México se lleva a cabo principalmente bajo condiciones de pastoreo extensivo en las regiones tropicales y se utiliza forraje de corte o en pastoreo, en ambos casos, el forraje es de gramíneas nativas e introducidas (Hernández-Medrano y Corona 2018). Así mismo, en sistemas de producción de leche en pequeña escala en los valles altos del centro de México el pastoreo se lleva a cabo en praderas cultivadas principalmente de festuca alta (*Lolium arundinaceum*), ballico (*Lolium perenne*), entre otras (López-González et al., 2020). Tanto en las zonas templadas como tropicales las gramíneas son la fuente principal de alimentación para los rumiantes (Torres-Salado et al. 2020). Sin embargo; la literatura sugiere que se pueden encontrar diferencias en los productos de la fermentación entre las especies forrajeras consumidas por los rumiantes (Eugène et al. 2021). Durante el proceso se producen diversos compuestos tales como: ácido acético, propiónico, butírico, CH₄ y CO₂. Los pastos fermentados en el rumen presentan diferentes valores de digestibilidad, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), producción de metano (CH₄) y bióxido de carbono (CO₂) (Camacho-Escobar et al. 2020). Archimède et al. (2011), reportaron diferencias en la producción de CH₄ en gramíneas C3 (gramíneas de clima templado) y C4 (gramíneas de clima tropical) de 33.7 vs 30.5 L. kg MS consumida⁻¹ en gramíneas C3 y C4 respectivamente. Sobre lo mismo Kamra et al. (2010) sugieren que la mayor producción de CH₄ asociados con la alimentación de gramíneas C4 puede atribuirse a un mayor contenido de carbohidratos estructurales y lignina, menor consumo y tasa de pasaje más lenta. Tanto CH₄ como CO₂ están estrechamente relacionados con el calentamiento global del planeta (Ku Vera, 2020). El CH₄ producido durante la digestión de los rumiantes es eructado a la atmosfera y contribuye con el 30% a las emisiones diarias de este compuesto (Black et al. 2021). Así mismo, también se produce una cantidad sustancial de dióxido de carbono (CO₂), con una relación CH₄: CO₂ de 4:1 (Clauss et al. 2020). Los sistemas de alimentación de rumiantes basados en

forrajes de alta calidad pueden disminuir la contribución de los gases efecto invernadero derivados de la agricultura y ganadería (Eugène et al. 2021). Por lo tanto, la identificación de estas características en las gramíneas que son la principal fuente de forraje puede ofrecer alternativas de alimentación más sustentables para los rumiantes. El objetivo de esta investigación fue: Evaluar la producción *in vitro* de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), y variables fermentativas de gramíneas templadas y tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

Las praderas templadas estuvieron establecidas en los Campus Puebla y Montecillo, y las tropicales en el área de praderas del Campus Veracruz, del Colegio de Postgraduados. La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo; localizado en la carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Estado de México.

Muestras

Los pastos templados que se colectaron en Montecillo fueron: *Lolium perenne* (Ballico perenne), *Festuca* spp. (*Festuca*), *Pennisetum clandestinum* (kikuyo) y los del Campus Puebla fueron: *Dactylis glomerata* (ovillo), *Lolium multiflorum* (Ballico anual). Las praderas de ambos lugares contaban con riego, se colectaron muestras a los 30 días del rebrote, cortando la parte aérea a 5 cm del ras del suelo utilizando un cuadrado de madera de 50 cm x 50 cm para hacer una muestra compuesta de cada especie. Las parcelas eran de 500 m², aproximadamente y se colectaron 10 muestras al azar en cada parcela. Los pastos de zonas tropicales fueron: *Brachiaria brizantha* (Insurgente), (*Cynodon nlemfuensis* (estrella), (*Panicum máximum* (Guínea) cv. *Tanzania*, (*Pennisetum purpureum* (elefante), *Andropogon gayanus* (llanero) y *Cynodon dactylon* (bermuda). Las praderas tenían cuatro años de establecidas, de temporal, y se aplicó el mismo método de muestreo que para los pastos tropicales. Estos pastos tenían

entre 35 y 40 días de rebrote.

Análisis químico

Las muestras de las gramíneas se secaron a 60 ° en una estufa de aire forzado, aproximadamente 48 h. Después se molieron a 1 mm en un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA[®]). La composición química de las gramíneas se determinó por los métodos de la AOAC (2005); materia seca (MS; método 930.15), cenizas (método 942.05), y proteína cruda (PC; método 984.13. El contenido de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y hemicelulosa se determinó con el método de Van Soest *et al.* (1991).

Producción *in vitro* de biogás

Se pesaron 0.5 g de materia seca (MS) y se colocaron en viales serológicos de 120 mL, se agregaron 45 mL de medio de cultivo para bacterias totales (Cobos y Yokoyama 1995). Las fuentes de energía se sustituyeron por las gramíneas a evaluar. Los viales con el pasto y el medio de cultivo se usaron como biofermentadores y se consideraron como una unidad experimental. Se incubaron a baño María a 39 °C y se inocularon con líquido ruminal fresco centrifugado a 1 257 xg por 3 minutos. Al finalizar la inoculación se tomó como la hora 0 de fermentación.

Inóculo

El líquido ruminal se colectó (250 mL) de una vaca Holstein con cánula en el rumen, dos horas después de la alimentación de la mañana, la cual se alimentó con alfalfa 40 g, ensilado de maíz 30 g y alimento concentrado para vacas en lactancia (30 g), por cada 100 g de dieta.

Medición *in vitro* de biogás

Se midió a las 24, 48 y 72 h y se sumó la cantidad de biogás total de 72 h de fermentación. La captura de biogás fue con el método de trampas de solución salina saturada (36 g de NaCl por 100 mL de agua destilada) a pH 2 descritas por Cobos *et al.* (2018). A las trampas que capturaron el biogás por las 72 h se les determinó la proporción de los gases (CH₄ y CO₂), la cual se midió con un cromatógrafo de

gases de Perkin Elmer[®]. Se utilizó una columna empacada Porapak y un detector de conductividad térmica; las condiciones de trabajo fueron: temperatura del horno, 80 °C, columna empacada (PKD), 170 °C y Detector de Conductividad Térmica, 130 °C. Los tiempos de retención fueron: 0.71 min para CH₄ y 1.05 para CO₂. El gas acarreador de la columna (PKD) fue helio a un flujo de 23 mL min⁻¹.

Análisis de las variables de fermentación

A las 72 h de fermentación se tomaron muestras de 1 mL de la fase líquida fermentada en tubos Eppendorf[®] de 2 mL; se fijaron con ácido metafosfórico al 25% en una proporción 4:1, y se congelaron a -4 °C, con el fin de conservar la muestra para posteriormente medir la concentración de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) por cromatografía de gases (Erwin *et al.* 1961), el análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Clarus 500 Perkin Elmer[®], con un detector de ionización de flama, y columna capilar Elite FFAP Perkin Elmer[®]. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura del horno; 115 °C por 0.25 min, 125 ° por 0.5 min y 130 °C por un min, la temperatura de la columna fue: 250 °C, se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 23.3 mL por minuto y aire e hidrógeno para combustión de la flama, la inyección se realizó de manera automática con un volumen de 1 µL. Los tiempos de aparición fueron de 1.3 min para el ácido acético, 1.6 min para el ácido propiónico y 2.15 min para el ácido butírico. El pH se midió directamente del fermentador con un potenciómetro marca ORION[®], calibrado a pH 4 y 7. Para determinar la concentración de bacterias ruminales, se tomó una muestra de 1 mL de la fase líquida del biofermentador y fijada con formaldehído al 10%. Se realizó el conteo directo en una cámara Petroff Houser[®] en un microscopio Olympus[®] a una magnificación de 1000X con la técnica de Harrigan, y MacCance, (1976). Para calcular la concentración final se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias totales, mL}^{-1} = (X)(FD)(2 \times 10^7).$$

Donde: X = media de los conteos de bacterias en

los cuadros de la cámara PetroffHausser[®]. FD = factor de dilución. 2×10^7 = factor de corrección de la cámara Petroff-Hausser[®] para una conversión de datos a un volumen de 1 mL.

Diseño experimental, variables evaluadas y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento. Las variables pH, concentración molar total de AGV, producción acetato, propionato y butirato, concentración de bacterias totales, producción de biogás total, CH₄ y CO₂ acumulados se midieron a las 72 h. Los resultados se analizaron con GLM de SAS (2011) y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Para cumplir con la normalidad y homogeneidad de varianzas, los datos de concentración de bacterias se transformaron a Log 10, previo al análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición química de las gramíneas evaluadas se muestra en la Tabla 1. El pH de las gramíneas a las 72 h de fermentación (Tabla 2) estuvo dentro del rango 6.0-6.9, en el cual se desarrollan las bacterias ruminales de manera óptima (Kamra 2010). Sin embargo, fue diferente entre las gramíneas ($P < 0.05$); *C. nlemfuensis* y *C. dactylon* tuvieron el pH más alto (6.9) en comparación con *L. perenne* (6.5). Se ha reportado que el pH cambia según el tipo de fermentación que se lleve a cabo; sustratos altos en carbohidratos estructurales incrementan la producción de hidrógeno y CO₂, precursores de la producción de CH₄, en contraste sustratos altos en carbohidratos solubles disminuyen el pH, pero reducen la producción de CH₄ (Poulsen et al. 2012). Los resultados son similares a los publicados por Camacho-Escobar et al. (2020) quienes evaluaron pastos tropicales *in vitro* en la Costa de Oaxaca, México y obtuvieron un pH promedio de 6.5 y Dillard et al. (2017) reportaron el pH de 6.8 en la fermentación de *Dactylis glomerata*.

Otro de los factores que intervienen en la formación del CH₄ en el rumen es la producción de

ácidos grasos volátiles (AGV; acético, propiónico y butírico) (Tabla 2). Las gramíneas templadas produjeron mayor cantidad de AGV ($P < 0.05$) lo que representa más del doble que las tropicales (86.27 mM y 39.42 Mm gramíneas templadas y tropicales, respectivamente). Especies como el *L. perenne*, *Dactylis glomerata*, *L. multiflorum* y *Pennisetum clandestinum* tuvieron mayor producción de AGV ($P < 0.05$). El pasto *Dactylis glomerata* produjo mayor cantidad de ácido propiónico y biogás total, estas características están asociadas e influyen de manera inversa; la ruta de formación de propionato compite directamente por el uso de hidrógeno en el rumen (Lascano et al. 2011), quedando una menor disposición de este para la producción de CH₄ (Martin et al. 2010), por el contrario la producción de ácido acético y butírico en el rumen resulta en una liberación neta de hidrógeno y favorece la producción de CH₄ (Lascano et al. 2011). Dillard et al. (2017) reportaron una fermentación similar para *Dactylis glomerata* (68.4, 21.9 mol por 100 mol producidos de acético propiónico y butírico), y 2.13 mg de CH₄ por g de materia orgánica consumida.

La producción de ácido acético se incrementó ($P < 0.05$) en gramíneas tropicales, las cuales también mostraron una disminución en ácido propiónico y butírico. Cabe señalar que los productos de la fermentación *C. nlemfuensis* considerada como una gramínea tropical tuvo un comportamiento similar a las gramíneas templadas. Aunque los metabolitos de la actividad bacteriana fueron diferentes, la población microbiana fue similar (70×10^9 mL⁻¹, $P > 0.05$).

La producción de biogás (Tabla 3) fue mayor en las gramíneas tropicales 182.61 mL g MS⁻¹ comparado con las templadas las cuales produjeron 89.84 mL g MS⁻¹, este mismo comportamiento se observó en la producción de CH₄ (66.93 y 26.73 mL MS⁻¹ respectivamente; Tabla 3), y CO₂ (121.58 y 49.52 mL g MS⁻¹). *Pennisetum purpureum* fue la gramínea con mayor producción de biogás ($P < 0.05$), CH₄ y CO₂ (282.17, 82.90, 174.66 mL, respectivamente) y *Dactylis glomerata* la que produjo menor ($P < 0.05$) cantidad (55.88, 23.28 y 36.87 mL, respectivamente). Este comportamiento puede ser explicado por la cantidad de FDN que en promedio

Tabla 1. Composición química de gramíneas templadas y tropicales (%)

Gramínea	MO	Cenizas	PC	FDN	FDA
<i>Lolium perenne</i>	88.06	11.94	11.15	67.87	44.59
<i>Pennisetum clandestinum</i>	85.33	14.67	24.90	57.72	33.55
<i>Festuca sp.</i>	85.29	14.71	22.86	50.72	32.70
<i>Lolium multiflorum</i>	85.12	14.88	13.61	57.52	38.16
<i>Dactylis glomerata</i>	86.29	13.65	24.83	56.27	35.00
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	87.88	12.12	10.69	73.40	41.21
<i>Brachiaria brizantha</i>	89.60	10.40	8.42	71.66	49.33
<i>Andropogon gayanus</i>	90.99	9.01	15.01	69.84	34.08
<i>Pennisetum purpureum</i>	89.47	10.53	8.12	76.25	46.14
<i>Panicum máximum cv Tanzania</i>	87.09	12.91	8.17	72.65	42.30
<i>Cynodon dactylon</i>	89.69	10.31	11.36	75.67	41.06

MO: Materia orgánica, PC: Proteína cruda, FDN: Fibra detergente neutro, FDA: Fibra detergente ácido.

Tabla 2. Características de fermentación de gramíneas templadas y tropicales.

Tratamiento/variable	pH	Bacterias totales	Acético	Propiónico	Butírico	AGV totales
	10 ⁹ mL ⁻¹	mM por 100	mM producidos		Mm	
<i>Lolium perenne</i>	6.69 ^{ab}	7.2 ^a	61.14 ^{cb}	26.14 ^a	12.71 ^c	95.95 ^a
<i>Pennisetum clandestinum</i>	6.49 ^b	11 ^a	63.89 ^b	22.20 ^b	13.91 ^b	85.19 ^{ab}
<i>Festuca sp.</i>	6.79 ^{ab}	4.6 ^a	63.81 ^b	21.87 ^b	14.31 ^{ab}	83.15 ^{bc}
<i>Lolium multiflorum</i>	6.79 ^{ab}	7.4 ^a	58.61 ^c	28.75 ^a	12.63 ^c	89.178 ^{ab}
<i>Dactylis glomerata</i>	6.86 ^{ab}	9.5 ^a	63.51 ^b	21.36 ^b	15.12 ^a	72.66 ^c
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	6.9 ^a	6.2 ^a	70.38 ^a	21.43 ^b	8.190 ^e	34.96 ^d
<i>Brachiaria brizantha</i>	6.79 ^{ab}	7.8 ^a	70.04 ^a	21.45 ^b	8.50 ^{de}	36.46 ^d
<i>Andropogon gayanus</i>	6.8 ^{ab}	7.5 ^a	69.91 ^a	22.09 ^b	7.98 ^e	41.62 ^d
<i>Pennisetum purpureum</i>	6.75 ^{ab}	4.2 ^a	70.57 ^a	21.09 ^b	8.33 ^e	38.69 ^d
<i>Panicum máximum cv Tanzania</i>	6.71 ^{ab}	4.4 ^a	69.07 ^a	23.01 ^b	7.90 ^e	39.85 ^d
<i>Cynodon dactylon</i>	6.66 ^a	7.3	62.91 ^b	27.57 ^a	9.31 ^d	44.9 ^d
EEM	0.78	0.71	0.56	0.18	2.28	

^{a,b,c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P < 0.05), mM: concentración milimolar, AGV; ácidos grasos volátiles, EEM: Error estándar de la media.

Tabla 3. Producción de biogás, metano y bióxido de carbono acumulado a 72 h (mL).

Tiempo de fermentación, h	Biogás	Metano	Bióxido de carbono
Tratamiento			
<i>Lolium perenne</i>	71.18 ^d	24.00 ^e	51.05 ^d
<i>Pennisetum clandestinum</i>	79.44 ^d	34.85 ^d	54.04 ^d
<i>Festuca sp.</i>	172.16 ^c	28.47 ^{de}	50.3 ^d
<i>Lolium multiflorum</i>	70.56 ^d	23.09 ^e	55.34 ^d
<i>Dactylis glomerata</i>	55.88 ^e	23.28 ^e	36.87 ^d
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	194.24 ^b	53.60 ^b	124.5 ^b
<i>Brachiaria brizantha</i>	200.51 ^b	53.07 ^b	120.5 ^{bc}
<i>Andropogon gayanus</i>	189.95 ^b	57.77 ^b	111.18 ^{bc}
<i>Pennisetum purpureum</i>	282.17 ^a	82.90 ^a	174.66 ^a
<i>Panicum máximum cv Tanzania</i>	157.7 ^c	43.23 ^{cd}	97.75 ^c
<i>Cynodon dactylon</i>	170.65 ^c	44.10 ^c	100.9 ^{bc}
EEM	5.96	3.03	8.44

a, b, c Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P < 0.05), EEM: Error estándar de la media.

contenían las gramíneas tropicales de este estudio 73.24% comparado con las templadas 58.02% lo que se relaciona directamente con la producción de CH₄, por la cantidad de paredes celulares. Sin embargo,

la cantidad de CH₄ fue menor a la reportada por Ley de Coss *et al.* (2018) quienes evaluaron gramíneas tropicales y reportaron en promedio 353.9 mL por gramo de MS fermentada. Resultados presentados

por Archimède *et al.* (2011) indican que animales alimentados con plantas C3, (de clima templado producen menos CH₄ que las C4 (de clima tropical) (30.0 L Kg MS⁻¹ consumida y 33.7 L Kg MS⁻¹ consumida).

El *Pennisetum purpureum* produjo mayor cantidad de ácido acético y menor de ácido propiónico características fermentativas que influyeron en la producción de biogás (CH₄ y CO₂) resultando la formación de H₂ disuelto en el rumen, factor clave que determina las vías de formación de AGV y los productos finales formados por los metanógenos ruminales que transforman el H₂ a CH₄ (Sun *et al.* 2022). Sawatdeenarunat *et al.* (2021) reportaron una producción similar de AGV de 63.85 donde también se reflejó mayor cantidad de ácido acético y menor de ácido propiónico (63.85 y 19.73 mM por cada 100 mM producidos de acético y propiónico, respectivamente). Las gramíneas con características fermentativas deseables fueron: *L. perenne*, *Dactylis glomerata*, y *L. multiflorum*, consideradas gramíneas templadas produjeron más AGV, ácido propiónico vs acético

también fueron los pastos que menos biogás produjeron, por lo que se puede asumir que sus carbohidratos eran menos disponibles y como consecuencia también obtuvieron menores cantidades de CH₄. Amaleviciute-Volunge *et al.* (2020) reportaron cantidades mayores de CH₄ en *Dactylis glomerata* 213.9L CH₄ kg MS⁻¹ y 205.7 L CH₄ kg⁻¹ en *L. perenne*. Sin embargo, Apráez *et al.* (2012) reportaron aproximadamente 45 mL CH₄ g MS⁻¹. Mellese *et al.* (2017) reportaron cantidades menores de aproximadamente 150 mL de biogás g MS⁻¹ y 30 mL de CH₄ g MS⁻¹ en gramíneas similares como *Barachiaria mutica*, *Cenchrus ciliaris* y *Chloris gayana*. Por lo que se concluye que: las gramíneas que tuvieron características fermentables deseables para la producción de rumiantes (mayor producción de AGV y cantidades menores de CH₄) fueron: *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata* y *Lolium Multiflorum*. Las cuales podrían ser incluidas en las dietas para rumiantes en las zonas templadas de México.

LITERATURA CITADA

- Amaleviciute-Volunge K, Slepeliene A, Butkute B (2020) Methane yield of perennial grasses as affected by the chemical composition of their biomass. *Zemdirbyste-Agriculture* 107: 243-248.
- Apráez JE, Delgado JM, Narváez JP (2012) Composición nutricional, degradación *in vitro* y potencial de producción de gas, de herbáceas, arbóreas y arbustivas encontradas en el trópico alto de Nariño. *Livestock Research for Rural Development* 24: 1-11.
- Archimède H, Eugène M, Magdeleine CM, Boval M, Martin C, Morgavi D, Lecomte P, Doreau M (2011) Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology* 166: 59-64.
- AOAC (2005) Official Methods of Analysis. Edition 18. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, EE.UU. 1928p.
- Black J L, Davison T, Box I (2021). Methane emissions from ruminants in Australia: Mitigation potential and applicability of mitigation strategies. *Animals* 951: 1-20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11040951>.
- Camacho-Escobar MA, Galicia-Jiménez MM, Sánchez-Bernal EI, Ávila-Serrano NY, López-Garrido SJ (2020) Producción de metano y bióxido de carbono *in vitro* de pastos tropicales de la costa de Oaxaca, México. *Terra Latinoamericana* 38: 425-434.
- Clauss M, Dittmann MT, Vendl C, Hagen KB, Frei S, Ortmann S, Kreuzer M (2020) Comparative methane production in mammalian herbivores. *Animal* 14: 113-123.
- Cobos MA, Yokoyama MT (1995) *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: Colonisation and degradation of shrimp carapaces. In: Workshop on Rumen Ecology Research Planning, Addis Ababa, Ethiopia, pp: 13-18.

- Cobos MA, Curzaynz KR, Rivas MI, Santillán EA, Bárcena JR (2018) Efecto *in vitro* de dietas para corderos más un suplemento de granos secos de destilería en la fermentación ruminal y emisiones de gases. *Agrociencia* 52: 203-215.
- Dillard SL, Hafila AN, Roca-Fernández AI, Brito AF, Rubano MD, Soder KJ (2017) Effect of feeding warm-season annuals with orchardgrass on ruminal fermentation and methane output in continuous culture. *Journal of dairy science* 100: 1179-1188.
- Erwin ES, Marco GJ, Emery EM (1961) Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 44: 1768-1771.
- Eugène M, Klumpp K, Sauvart D (2021) Methane mitigating options with forages fed to ruminants. *Grass and Forage Science* 76: 196-204.
- Harrigan WF, MacCance ME (1976) Determination of the number of viable organisms in a sample. In: Harrigan WF, MacCance ME (ed). *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press. London and New York. pp: 21-29
- Hernández-Medrano JH, Corona L (2018) El metano y la ganadería bovina en México: ¿Parte de la solución y no del problema? *Agroproductividad* 11: 46-51.
- Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC, Bhar R (2010) Methane emissions by livestock in India and mitigation strategies. In *Sustainable Improvement on animal Production and health*. In: Odongo NE, Garcia M, Viljoen GJ (eds). FAO/IAEA. Viena Austria. pp: 75-78.
- Ku-Vera JC, Castelán-Ortega OA, Galindo-Maldonado FA, Arango J, Chirinda N, Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar SS, Flores-Santiago EJ, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, Piñeiro-Vázquez AT, Arceo-Castillo JI, Aguilar-Pérez CF, Ramírez-Avilés L, Solorio-Sánchez FJ (2020) Strategies for enteric methane mitigation in cattle fed tropical forages. *Animal* 14: 453-463.
- Lascano CE, Carulla JE, Vargas JJ (2011) Strategies for reducing methane emissions from ruminants. *Revista Brasileira de Geografía Física* 6: 1315-1335.
- Ley de Coss A, Guerra-Medina E, Montañez-Valdez O, Guevara HF, Pinto R, Reyes-Gutiérrez J (2018). Producción *in vitro* de gas metano por gramíneas forrajeras tropicales. *Revista MVZ Córdoba* 23: 6788-6798.
- López-González F, Cantú-Patiño MG, Gama-Garduño O, Prospero-Bernal F, Colín-Navarro V, Arriaga-Jordán CM (2020) Praderas de festuca alta y ryegrass en pastoreo de vacas lecheras en sistemas de producción de leche en pequeña escala en los Valles Altos del Centro de México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23(39): 1-10.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M (2010) Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351-365.
- Melesse A, Steingass H, Schollenberger M, Rodehutschord M (2017) Screening of common tropical grass and legume forages in Ethiopia for their nutrient composition and methane production profile *in vitro*. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales* 5: 163-175.
- Poulsen M, Jensen BB, Engberg RM (2012). The effect of pectin, corn and wheat starch, inulin, and pH on *in vitro* production of methane, short chain fatty acids and on the microbial community composition in rumen fluid. *Anaerobe* 18: 83-90.
- SAS 2011. SAS/STAT Software. Version 9.3. Cary, NC SAS, USA: Institute INC, 906p.

- Sun X, Cheng L, Jonker A, Munidasa S, Pacheco DA (2022) Review: Plant carbohydrate types-the potential impact on ruminant methane emissions. *Frontiers in Veterinary Science* 17(9): 880115. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.880115>
- Sawatdeenarunat C, Nirunsin R, Chaiprapat S (2021) Enhanced volatile fatty acids production from Napier grass (*Pennisetum purpureum*) using micro-aerated anaerobic culture. *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 43: 1793-1799.
- Torres-Salado N, Moctezuma-Villar M, Rojas G, Maldonado- Peralta M A, Gómez-Vázquez A, Sánchez-Santillán P (2020) Comportamiento productivo y calidad de pastos híbridos de *Urochloa* y estrella pastoreados con bovinos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11: 35-46.
- Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.