

***In vitro* production of gas methane by tropical grasses**

Producción *in vitro* de gas metano por gramíneas forrajeras tropicales

Alejandro Ley de Coss¹ Ph.D, Cándido Guerra-Medina^{2,3} Ph.D, Oziel Montañez-Valdez^{3*} Ph.D, Francisco Guevara H² Ph.D, René Pinto R² Ph.D, José Reyes-Gutiérrez³ Ph.D.

¹Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agronómicas, Campus V, Carretera Ocozacoautla-Villaflores kilómetro 84.5, Villaflores, Chiapas, México. ²Centro de Investigación del Pacífico Sur, INIFAP, Carretera Tapachula - Cacahoatan Km. 18, Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Tapachula, Chiapas, México CP. 30470. ³Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur. Grupo de Investigación en Nutrición Animal, Ave. Enrique Arreola Silva 883, Ciudad Guzmán, Jalisco. 49000. *Correspondence: montanez77@hotmail.com

Received: May 2017; Accepted: December 2017.

ABSTRACT

Objective. Estimate the production of methane (CH₄) by tropical grasses fermented *in vitro*. **Materials and methods.** A sample of 20 g dry matter of *Cynodon nlemfuensis*, *Hyparrhenia rufa*, *Megathyrsus maximus* and *Digitaria swazilandensis* plus 200 ml of culture medium were plated in triplicate flasks sterile stainless steel with CO₂ flux, inoculated with 20 ml of ruminal fluid bovine, incubated at 38 °C for 24, 48, 72 and 96 h. Total production of gas, CH₄, volatile fatty acids, and pH were evaluated in a completely randomized design with three replicates per treatment and comparison of means with Tukey; the concentration of total and cellulolytic bacteria were analyzed with the Kruskal-Wallis, and the GLM procedure independent data Wilcoxon rank. **Results.** *H. rufa* and *D. swazilandensis* both had the lowest total gas production (p<0.05), while *D. swazilandensis* had lower production of CH₄, increased production of propionic acid (p<0.05) and lower pH 96 hours of incubation (p<0.05). *D. swazilandensis* showed greater efficiency in energy production due to reduced production of CH₄ and increased propionate production. The concentration of total bacteria was similar between treatments (p>0.05), while the concentration of cellulolytic bacteria was lower in *C. nlemfuensis* y *D. swazilandensis* when 96 of incubation (p<0.05). **Conclusions.** The *Digitaria swazilandensis*, showed favorable conditions to have lower total methane and total gas production.

Keywords: Grasses; *in vitro* digestibility; methane; (Source: *Tesaurus de la biblioteca nacional de agricultura*).

RESUMEN

Objetivo. Estimar la producción de metano (CH₄) por gramíneas tropicales fermentadas *in vitro*. **Materiales y métodos.** Una muestra de 20 g de materia seca de *Cynodon nlemfuensis*, *Hyparrhenia rufa*, *Megathyrsus maximus* y *Digitaria swazilandensis* más 200 ml de medio de cultivo se depositaron por triplicado en frascos de acero inoxidable estériles con flujo de CO₂, se inocularon con 20 ml de líquido ruminal de bovino e incubaron a 38 °C por 24, 48, 72 y 96 h. Se evaluó producción total de gas, CH₄, ácidos grasos volátiles, y pH en un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento y la comparación de medias con Tukey; la concentración de bacterias totales y

celulolíticas, se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis, y el procedimiento GLM con datos de rangos independientes de Wilcoxon. **Resultados.** *H. rufa* y *D. swazilandensis* tuvieron la menor producción total de gases ($p < 0.05$), mientras que *D. swazilandensis* tuvo menor producción de CH_4 , mayor producción de ácido propiónico ($p < 0.05$) y menor pH a las 96 horas de incubación ($p < 0.05$). *D. swazilandensis* mostró mayor eficiencia en la producción de energía por la menor producción de CH_4 y mayor producción de propionato. La concentración de bacterias totales fue similar entre tratamientos ($p > 0.05$), mientras que la concentración de bacterias celulolíticas fue menor en *C. nlempfuensis* y *D. swazilandensis* a la hora 96 de incubación ($p < 0.05$). **Conclusiones.** La *Digitaria swazilandensis*, mostró condiciones favorables para tener menor producción total de metano y gases totales.

Palabras clave: Digestibilidad *in vitro*; gramíneas; metano (Fuente: Tesauro de la biblioteca nacional de agricultura).

INTRODUCTION

Ruminants emit between 18 and 25% of the greenhouse gases (GHG), depending on the feeding strategy that has been established, CH_4 is the second largest contributor to this effect (1-4). Ruminant feed in tropical and subtropical regions is mainly based on the use of forage grasses whose cellulose and hemicellulose content is higher than in temperate climate grasses (5), this higher cell wall content being potentially fermented by cellulolytic bacteria species such as *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes*, which transform glucose into acetate and butyrate, whose metabolic pathway produces hydrogen (H_2) and carbon dioxide (CO_2), which are the main substrates for methanogenic archaea such as *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina bacteri* and *Methanosarcina majei* (6), where the highest production of CH_4 is produced by this metabolic pathway (6,7).

The production of CO_2 and CH_4 is a necessary process in ruminal biochemistry to obtain energy, this process reduces the accumulation of H_2 and pH reduction, to maintain ruminal ecology under favorable conditions (8). However, this process reduces the efficiency of energy use by the animal by 6.3% for sheep and 6.5% for cattle (9).

The use of tropical forage grasses with higher cell content and lower potentially fermentable cell wall content in ruminant feed could allow for greater energy efficiency that contributes to reducing GHG emissions for the purpose of mitigating climate change, Zheng et al (3) and Iñamaga et al (4), reported that feed strategies influenced GHG emissions, also indicate that CO_2 emissions based on the production of fat-corrected milk were higher for high forage feeding strategies. Therefore, the objective of this research was to evaluate the production of total gases (GT) and CH_4 emitted by tropical fodder grasses on *in vitro* incubation (3,4).

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes emiten entre 18 y 25% de los gases que causan el efecto invernadero (GEI), dependiendo de la estrategia de alimentación que se tenga, el CH_4 es el segundo gas que contribuye a este efecto (1-4). La alimentación de los rumiantes en las regiones tropicales y subtropicales se basa principalmente en el uso de pastos forrajeros cuyo contenido de celulosa y de hemicelulosa, es mayor que en los pastos de clima templado (5), éste mayor contenido de pared celular es potencialmente fermentado por especies de bacterias celulolíticas como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes*, que transforman la glucosa en acetato y butirato, cuya ruta metabólica produce hidrógeno (H_2) y bióxido de carbono (CO_2), que son los substratos principales para las archaeas metanogénicas como *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina bacteri* y *Methanosarcina majei* (6) donde la mayor producción de CH_4 se tiene mediante esta vía metabólica (6,7)

La producción de CO_2 y CH_4 es un proceso necesario en la bioquímica ruminal para la obtención de energía, este proceso reduce la acumulación de H_2 y la caída del pH, para mantener la ecología ruminal en condiciones favorables (8). Sin embargo, este proceso reduce la eficiencia de utilización de la energía por el animal, 6.3% para ovinos y 6.5% para bovinos (9).

El uso de pastos forrajeros tropicales con mayor contenido celular y menor contenido de pared celular potencialmente fermentable en la alimentación de los rumiantes, podría permitir mayor eficiencia energética que contribuya a reducir la emisión de GEI con el propósito de mitigar el cambio climático, Zheng et al (3) and Iñamaga et al (4) mencionan que las estrategias de alimentación influyen en las emisiones de GEI, incluso, indican que las emisiones de CO_2 con base en la producción de leche corregida

MATERIALS AND METHODS

Area of study. The study was developed in the Laboratory of Animal Science of the Faculty of Agricultural Sciences, Campus IV of the University Autonomous University of Chiapas located in Huehuetán, Chiapas, Mexico and the Ruminant Microbiology and Microbial Genetics Laboratory of the Postgraduate School Livestock Program, Montecillos Campus, Texcoco, Mexico.

Treatments and chemical analysis of grasses. The treatments (pastures) evaluated were T1: *Cynodon nlemfuensis*; T2: *Hyparrhenia rufa*; T3: *Megathyrsus maximus* and T4: *Digitaria swazilandensis*; with an age of 75 days, during the month of May 2015 (average temperature of 24.81°C, relative humidity of 72.86% and 277 mm of accumulated monthly precipitation at the time of sampling, and 1438.9 mm of precipitation during the year), was obtained from a cattle ranch (El Carmen 9, in Mazatán, Chiapas) located at 14°54'23.93" N and 92°25'37.81" O; 35 meters above sea level. With soil of the Phaeozem (Feosem) type, characterized by a high accumulation of organic matter and by being saturated at the top, the soil is mainly prairie soil, with a móllic epipedion (a relatively thick, dark, humus-rich surface horizon) and without calcium carbonate in the first meter of depth; no fertilization was carried out on the areas of the sampled forage.

The samples were dried in a drying oven at 60°C for 24 hours and ground in an ED-5 electric mill equipped with a 1 mm screen. For each of the samples, crude protein (CP) was determined by the Kjeldahl method, as well as ethereal extract (EE) and ash content after incineration of the sample in a muffle at 550°C per 4 h according to AOAC (10). Determination of the neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) fractions according to the technique described by Van Soest et al (11).

The culture medium (Table 1) used to determine the production of total gases (GT) and methane (CH₄), in addition to the degradation of MS, was prepared under sterile conditions and CO₂ flow. The inoculum was fresh rumen fluid (FRF) extracted at 2 h *pos-prandium* from a 500 kg BW bovine (F1, zebu x swiss) with rumen cannula, which received *at libitum* (received the first ration at 6:00 am and second at 4:00 pm) a diet based on 85% *C. nlemfuensis* and 15% of a concentrated feed containing 2.7 Mcal of ME and 14% crude protein.

en grasa fueron mayores para las estrategias de alimentación altas en forraje, por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de gases totales (GT) y CH₄ emitidos por gramíneas forrajeras tropicales en incubación *in vitro* (3,4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas, *Campus IV* de la Universidad Autónoma de Chiapas ubicada en Huehuetán, Chiapas, México, y en el Laboratorio de Microbiología Ruminant y Genética Microbiana del Programa en Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Texcoco, México.

Tratamientos y análisis químico de las gramíneas. Los tratamientos (pastos) evaluados fueron T1: *Cynodon nlemfuensis*; T2: *Hyparrhenia rufa*; T3: *Megathyrsus maximus* y T4: *Digitaria swazilandensis*; con una edad al corte de 75 días, durante el mes de mayo de 2015 (temperatura media de 24.81°C, humedad relativa de 72.86% y 277 mm de precipitación acumulada mensual al momento de muestreo, y 1438.9 mm de precipitación en el año), se obtuvo de un rancho ganadero (El Carmen 9, en Mazatán, Chiapas) ubicado a 14°54'23.93" N y 92°25'37.81" O; 35 msnm. Con suelo de tipo Phaeozem (Feosem), caracterizado por tener una alta acumulación de materia orgánica y por estar saturados en bases en su parte superior, son suelo principalmente de pradera, con un epipedión móllico (horizonte superficial relativamente grueso, oscuro y rico en humus) y sin carbonato cálcico en el primer

Table 1. Culture medium for measuring total gas production, methane and *in vitro* degradation of dry matter.

Compound	Quantity (ml) for 100 ml of medium
Distilled water	52.9
Clarified rumen liquid ⁽¹⁾	30.0
Mineral solution I ⁽²⁾	5.0
Mineral solution II ⁽³⁾	5.0
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃), 8% ⁽⁴⁾	5.0
Sulphide-cysteine solution ⁽⁵⁾	2.0
Resazurin solution 0.1% ⁽⁶⁾	0.1

(1) Clarified filtered rumen liquid filtered centrifuged at 17664 g for 15 min and sterilized 20 min at 21°C at 15 psi. (2) Contains (in 1000 ml) 6 g K₂HPO₄. (3) Contains (in 1000 ml H₂O), 6 g KH₂PO₄, 6 g (NH₄)₂SO₄, 12 g NaCl, 2.45 g MgSO₄ and 1.6 g CaCl₂·H₂O. (4) 8 g Na₂CO₃ in 100 ml H₂O distilled. (5) 2.5 g L-cysteine (in 15 ml 2N NaOH) + 2.5 g Na₂S-9H₂O (in 100 ml H₂O). (6) 0.1 ml resazurine in a volume of 100 ml.

Production of CH₄. The *in vitro* production of GT and CH₄ was determined in triplicate with repetition over time of each treatment (grasses) using bottles (biodigesters) with a capacity of 2.0 L with hermetic seal, where the following mixture was added under aseptic and CO₂ flow conditions: 20 g of MS from each grass (1 g of MS for each 10 mL of medium) according to the Williams technique (12) plus 200 ml of culture medium (Table 1) each treatment was inoculated with 20 ml of FRF filtered in cotton gauze, incubated at 38±0.5°C under CO₂ flow for 24, 48, 72 and 96 h in a thermoregulation bath. The initial total bacterial concentration was 1.35 x10⁸ CFU ml⁻¹ based on the most probable number technique (MPN, 13) at pH 6.74. At the end of the incubation period, the production of total gases (GT) in the system was measured by moving liquids through a trap with Mariotte flasks. The displaced water was collected in a 500 ml graduated cylinder and thus the amount of GT per 20 g of fermented MS was determined.

To determine the amount of CH₄ produced in each treatment, in a second test and under the same culture conditions, times and repetitions, in the Mariotte flask traps was added a solution of NaOH (2N) with pH of 13.67 according to the technique described by Stolaroff (14); the NaOH solution reacts with CO₂ to form sodium carbonate (Na₂CO₃) and the remaining gases released are a mixture of CH₄, H₂, N₂ and hydrogen sulphide (15). The CO₂ trap was coupled to the biodigesters using a Tygon hose (internal Φ 5 mm and a length of 35 cm) that was fitted with a hypodermic needle (31.8 mm) and 10 cm long). In all GT production evaluations, the results of each treatment and its respective repetition were corrected for difference with the gas production of the blank samples (200 ml of culture medium plus 20 ml of FRF).

Production of volatile fatty acids (VFA) and microbiological variables. At the end of each incubation period 5 ml of culture medium were obtained and centrifuged at 18000 G for 10 min; 2.0 ml of the supernatant was mixed 4:1 with 25% metaphosphoric acid, the vials were shaken in a Vortex and re-centrifuged at 35000 G for two minutes, the concentration of VFA was measured using a Claurus 500 gas chromatograph, using the technique and conditions described by Ley de Coss et al (16). In addition, per incubation period, 0.5 ml of culture medium was obtained from each treatment to estimate the concentration of total bacteria (BT) and cellulolytic bacteria (BC) using the MPN technique and culture media similar to those reported by Ley de Coss et al (17), which consisted to BT: 0.06 g D-(+)-glucose + 0.06 g D-cellobiose + 0.06 g starch, 30 ml clarified FR,

metro de profundidad; no se realizó ningún tipo de fertilización en las áreas de los forrajes muestreados.

Las muestras se secaron en una estufa de secado a 60°C por 24 h y se molieron en un molino eléctrico ED-5, equipado con criba de 1 mm. A cada una de las muestras se determinó, proteína cruda (PC) por el método Kjeldahl, así como extracto etéreo (EE) y el contenido de cenizas después de incinerar la muestra en una mufla a 550°C por 4 h según lo descrito por la AOAC (10). La determinación de las fracciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo con la técnica descrita por Van Soet et al (11).

Medio de cultivo. El medio de cultivo (Tabla 1) utilizado para determinar la producción de gases totales (GT) y metano (CH₄), además de la degradación de la MS fue preparado en condiciones de esterilidad y flujo de CO₂. El inóculo fue el fluido ruminal fresco (FRF) extraído a las 2 h *pos-prandium* de un bovino (F1, cebú x suizo) de 500 kg PV con cánula ruminal, el cual recibió *at libitum* (recibió la primera ración a las 6:00 am y segunda a las 4:00 pm) una dieta a base de 85% de *C. nlemfuensis* y 15% de un alimento concentrado que contenía 2,7 Mcal de EM y 14% de proteína cruda.

Producción de CH₄. La producción *in vitro* de GT y CH₄ se determinó por triplicado con repetición en el tiempo de cada tratamiento (gramíneas) mediante frascos (biodigestores) con capacidad de 2.0 L con selladura hermética, donde se adiciónó bajo condiciones de asepsia y flujo de CO₂ la siguiente mezcla: 20 g de MS de cada pasto (1 g de MS por cada 10 mL de medio) según técnica de Williams (12) más 200 ml de medio de cultivo (Tabla 1) cada tratamiento se inoculó con 20 ml de FRF filtrado en gasa de algodón, incubado a 38 ± 0.5°C bajo flujo de CO₂ por 24, 48, 72 y 96 h en baño de termorregulación. La concentración inicial de bacterias totales fue de 1,35 x10⁸ UFC ml⁻¹ con base en la técnica de número más probable (NMP, 13) a pH de 6.74. Al terminar el periodo de incubación se midió la producción de gases totales (GT) en el sistema, mediante el desplazamiento de líquidos a través de una trampa con frascos de Mariotte. El agua desplazada se recolectó en una probeta graduada de 500 ml y con ello se determinó la cantidad de GT por los 20 g de MS fermentada.

Para determinar la cantidad de CH₄ producido en cada tratamiento, en una segunda prueba y bajo las mismas condiciones de cultivo, tiempos y repeticiones, en las trampas de frascos Mariotte se adiciónó una solución de NaOH (2N) con pH

5.0 ml mineral solution I [6 g K_2HPO_4 in 1000 ml H_2O], 5.0 ml mineral solution II [6 g KH_2PO_4 + 6 g KH_2PO_4 + 6 g $(NH_4)_2SO_4$ + 12 g NaCl + 2.45 g $MgSO_4$ + 1.6 g $CaCl_2 \cdot H_2O$ in 1000 ml H_2O], 2.0 ml 8% Na_2CO_3 solution, 2 ml sulphide-cysteine solution (2.5 g L-cysteine in 15 ml NaOH (2N) + 2.5 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ dissolved in 100 ml H_2O), 0.2 g peptone tripticate and 0.1 ml of 0.1% resazurine solution; and for BC a similar medium was used, and only the energy source (glucose+cellobiose+starch) was replaced by a strip of Whatman paper as a cellulose source (18).

Design and statistical analysis. The experimental design was completely randomized with three repetitions per treatment for each incubation period. Data on total gas production, CH_4 , AGV concentration and pH of the culture medium were analyzed with the SAS GLM procedure (19), while data on BT and BC concentration were analyzed with the Kruskal-Wallis test, with the GLM procedure with data from independent ranges (Wilcoxon) and averages were compared with the Tukey test ($p < 0.05$) with SAS.

RESULTS

The lowest total gas production was in *H. rufa* and *D. swazilandensis*, in the latter species it had lower CH_4 production, indicating higher energy production efficiency due to higher propionic acid synthesis. There was no change in BT concentration; however, in pastures with lower CH_4 synthesis there was lower BC concentration. Table 2 shows the results of the chemical composition of the grasses, showing that the crude protein content of *H. rufa* was less than 7%, while in *C. nlemfuensis*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* it was greater than 9%. The NDF content, the lowest value was *H. rufa* (63.25%), while *D. swazilandensis* had the highest content of this compound (71.40%), with an 8.15% difference between the two species, when related to the ADF content that was similar among the four species (42.25 to 43.40%), it can be attributed that the highest content of NDF in *D. swazilandensis* could be due to the higher content of hemicellulose.

Total production of gases and CH_4 . In all the fermented pastures, the highest proportion of gases (Table 3) was obtained in the period from 48 to 72 h, which indicates that in this period the highest activity of the bacteria to degrade the substrate was obtained. When considering the total accumulated gas production per g^{-1} of dry matter fermented (DMf), it was lower for *H. rufa* and *D. swazilandensis* ($p < 0.05$).

de 13.67 según la técnica descrita por Stolaroff (14) la solución de NaOH reacciona con el CO_2 para formar carbonato de sodio (Na_2CO_3) y el resto de gases liberados son una mezcla de CH_4 , H_2 , N_2 y ácido sulfhídrico (15); la trampa de CO_2 se acopló a los biodigestores mediante una manguera de Tygon (Φ interno de 5 mm y una longitud de 35 cm) a la que se le colocó una aguja hipodérmica (de 31.8 mm y 10 cm de largo). En todas las evaluaciones de producción de GT, los resultados de cada tratamiento y su respectiva repetición fueron corregidos por diferencia con la producción de gas de las muestras blanco (200 ml de medio de cultivo más 20 ml de FRF).

Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y variables microbiológicas. Al terminar cada periodo de incubación 5 ml de medio de cultivo se obtuvieron y se centrifugaron a 18000 G por 10 min; 2.0 ml del sobrenadante se mezclaron 4:1 con ácido metafosfórico al 25%, los viales fueron agitados en un Vortex y se volvieron a centrifugar a 35000 G durante dos minutos, la concentración de AGV se midió usando un Cromatógrafo de gases Claurus 500, usando la técnica y condiciones descritas por Ley de Coss et al (16). Además, por periodo de incubación se obtuvo 0.5 ml de medio de cultivo de cada tratamiento para estimar la concentración de bacterias totales (BT) y bacterias celulolíticas (BC) usando la técnica NMP y medios de cultivo similares a lo reportado por Ley de Coss et al (17) que consiste para BT en: 0.06 g de D-(+)-glucosa + 0.06 g D-celobiosa + 0.06 g de almidón, 30 ml de FR clarificado, 5.0 ml de solución mineral I [6 g K_2HPO_4 en 1000 ml de H_2O], 5.0 ml de solución mineral II [6 g KH_2PO_4 + 6 g $(NH_4)_2SO_4$ + 12 g NaCl + 2.45 g $MgSO_4$ + 1,6 g $CaCl_2 \cdot H_2O$ en 1000 ml de H_2O], 2.0 ml de solución al 8% de Na_2CO_3 , 2 ml de solución sulfido-cisteína (2.5 g L-cisteína en 15 ml de NaOH (2N) + 2.5 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ aforado en 100 ml de H_2O), 0.2

Table 2. Chemical composition (%) of tropical grasses *C. nlemfuensis*, *H. rufa*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* at the age of 75 days.

Nutrient	<i>C. nlemfuensis</i> <i>H. rufa</i> <i>M. maximus</i> <i>D. swazilandensis</i>			
	%			
CP	9.56	6.36	9.54	10.35
EE	1.85	1.25	1.92	2.35
NDF	67.24	63.25	67.25	71.40
ADF	42.56	42.25	42.25	43.40
Hemicellulose	24.68	21.00	25.00	28.00
Ashes	6.72	8.78	8.25	9.25

Table 3. Total gas production of tropical grasses *C. nlemfuensis*, *H. rufa*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* on *in vitro* incubation.

Time	<i>C. nlemfuensis</i>	<i>H. rufa</i>	<i>M. maximus</i>	<i>D. swazilandensis</i>	SEM ¹
	ml g DMF ⁻¹				
96	156 ^b	239 ^a	212 ^a	129 ^b	17.6
72	525 ^a	356 ^c	521 ^{ab}	442 ^a	21.4
48	255 ^a	242 ^a	252 ^a	254 ^b	42.3
24	170 ^a	148 ^{ab}	128 ^b	122 ^b	27.7
Total	1106^a	985.0^b	1113^a	947^b	58.7

a, b, c Means with different letters in the same row are different (p<0.05)
¹ Standard error of mean.

In the same way as GT production, the largest proportion in the production of CH₄ (Table 4) occurred in the period from 48 to 72 h, but the total accumulated production of CH₄ was similar between *C. nlemfuensis*, *H. rufa* and *D. swazilandensis* (p>0.05) as well as between *C. nlemfuensis*, *H. rufa* and *M. maximus* (p>0.05), while there was a difference between *M. maximus* and *D. swazilandensis* with lower production (p<0.05).

Table 4. CH₄ production by period and total accumulated CH₄ of tropical grasses *C. nlemfuensis*, *H. rufa*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* on *in vitro* incubation.

Time	<i>C. nlemfuensis</i>	<i>H. rufa</i>	<i>M. maximus</i>	<i>D. swazilandensis</i>	SEM ¹
	ml g DMF ⁻¹				
96	118.5 ^b	183.3 ^a	162.6 ^a	98.9 ^b	21.2
72	373 ^a	273.8 ^b	398.8 ^a	338.8 ^a	32.1
48	195.1 ^a	185.1 ^a	192.7 ^a	192.0 ^a	16.3
24	130.1 ^a	113.4 ^{ab}	95.9 ^b	93.3 ^b	13.5
Total	816.7^{ab}	755.8^{ab}	852.2^a	723.9^b	101.9

a, b, c Means with different letters in the same row are different (p<0.05)
¹ Standard error of mean.

In relation to the percentage of CH₄ of total gas production, for the grasses *H. rufa*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* represented 76.5%, while for *C. nlemfuensis* it was 73.9%, which indicates that the highest proportion of gas produced during fermentation corresponds to this GHG.

The total production of VFA and acetic acid production was similar in the grasses evaluated (p>0.05), while *D. swazilandensis* had higher production of propionic (p<0.05) and butyric acids (p<0.05). The acetic: propionic ratio showed that during the fermentation of *D. swazilandensis* the energy loss was lower and was related to the lower production of CH₄ obtained (Table 5).

g de tripticasa peptona y 0.1 ml de solución al 0.1% de resazurina; y para las BC se utilizó un medio similar al anterior, y solo se sustituyó la fuente de energía (glucosa+celobiosa+almidon) por una tira de papel Whatman como fuente de celulosa (18).

Diseño y análisis estadístico. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento por cada periodo de incubación. Los datos de producción total de gases, CH₄, concentración de AGV y pH del medio de cultivo se analizaron con el procedimiento GLM de SAS (19), mientras que para los datos de concentración de BT y BC se usó la prueba de Kruskal-Wallis, con el procedimiento GLM con datos de rangos independientes (Wilcoxon) y las medias se compararon con la prueba de Tukey (p<0.05) con SAS.

RESULTADOS

La menor producción de gases totales fue en *H. rufa* y *D. swazilandensis*, en la última especie tuvo menor producción de CH₄, indicando una mayor eficiencia en la producción de energía debido a la mayor síntesis de ácido propiónico. No hubo cambios en la concentración de BT, sin embargo, en los pastos con menor síntesis de CH₄ hubo menor concentración de BC. La tabla 2 muestra los resultados de la composición química de las gramíneas, se observa que el contenido de proteína cruda de *H. rufa* fue inferior a 7%, mientras que en *C. nlemfuensis*, *M. maximus* y *D. swazilandensis* fue mayor a 9%. Con respecto al contenido de FDN, el valor más bajo lo tuvo *H. rufa* (63.25%), mientras que *D. swazilandensis* tuvo el contenido más alto de éste compuesto (71.40%), con 8.15% de diferencia entre ambas especies, al relacionarlo con el contenido de FDA que fue similar entre las cuatro especies (42.25 a 43.40%), puede atribuirse que el mayor contenido de FDN en *D. swazilandensis* pudiera ser por el mayor contenido de hemicelulosa.

Producción total de gases y CH₄. En todos los pastos fermentados, la mayor proporción de gases (Tabla 3) se tuvo en el periodo de 48 a 72 h, lo que indica que en este periodo se tuvo la mayor actividad de las bacterias para degradar el sustrato. Al considerar la producción total de gas acumulado por g⁻¹ de materia seca fermentada (MSf), fue menor para *H. rufa* y *D. swazilandensis* (p<0.05).

Al igual que la producción GT, la mayor proporción en la producción de CH₄ (Tabla 4) ocurrió en el periodo de 48 a 72 h, pero la producción

Table 5. Production of volatile fatty acids from tropical grasses *C. nlemfuensis*, *H. rufa*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* in vitro incubation.

	<i>C. nlemfuensis</i>	<i>H. rufa</i>	<i>M. maximus</i>	<i>D. swazilandensis</i>	SEM ¹
	mmol L ⁻¹				
Acetic	74.28 ^a	73.81 ^a	73.81 ^a	64.17 ^a	14.6
Propionic	18.80 ^b	16.20 ^b	16.20 ^b	38.23 ^a	9.3
Butyric	9.43 ^{ab}	4.86 ^b	4.86 ^b	12.26 ^a	4.3
Total	102.43 ^a	94.87 ^a	94.87 ^a	114.60 ^a	33.25
A:P	3.95 ^b	3.50 ^b	3.5 ^b	1.67 ^a	0.34

^{a, b, c} Means with different letters in the same row are different ($p < 0.05$)

¹ Standard error of mean.

Table 6, shows the pH of the medium during 96 h of fermentation. *D. swazilandensis* and *M. maximus* had the lowest pH at 24, 72 and 96 h of incubation, even less than 6 at 96 h.

Table 6. pH of the culture medium in which the tropical grasses *C. nlemfuensis*, *H. rufa*, *M. maximus* and *D. swazilandensis* were fermented in vitro.

Hours	<i>C. nlemfuensis</i>	<i>H. rufa</i>	<i>M. maximus</i>	<i>D. swazilandensis</i>	SEM ¹
96	6.11 ^{ab}	6.53 ^a	5.95 ^b	5.88 ^b	0.12
72	6.74 ^a	6.64 ^a	6.09 ^b	6.24 ^{ab}	0.26
48	6.65 ^a	7.02 ^a	6.84 ^a	6.34 ^a	0.30
24	7.14 ^a	6.95 ^a	6.95 ^a	6.30 ^b	0.31

^{a, b, c} Means with different letters in the same row are different ($p < 0.05$)

¹ Standard error of mean.

There was no difference in BT concentration among treatments ($p > 0.05$) during the entire incubation period and the maximum concentration, in all treatments, was 10^9 cells ml⁻¹ of culture medium. Regarding the concentration of cellulolytic bacteria, at 24 h of incubation, the highest concentration was observed in *C. nlemfuensis* ($p < 0.05$), at 48 and 72 hours there was no difference among treatments ($p > 0.05$); while at 96 hours it was lower ($p < 0.05$) in *C. nlemfuensis* and *D. swazilandensis* (Table 7).

DISCUSSION

Generally, grasses have a low crude protein content, with a lower nitrogen content that limits microbial activity in the rumen (20), Avellaneda et al (21), report values of 6.37 and 71.96% crude protein and NDF, respectively in Guinea grass (*Panicum maximum var Mombasa*),

total acumulada de CH₄ fue similar entre *C. nlemfuensis*, *H. rufa* y *D. swazilandensis* ($p > 0.05$) al igual que entre *C. nlemfuensis*, *H. rufa* y *M. maximus* ($p > 0.05$), mientras que hubo diferencia entre *M. maximus* y *D. swazilandensis* con menor producción en ésta última ($p < 0.05$).

En relación con el porcentaje de CH₄ respecto a la producción total de gas, para las gramíneas *H. rufa*, *M. maximus* y *D. swazilandensis* representó el 76.5%, mientras que para *C. nlemfuensis* fue de 73.9%, lo que indica que la mayor proporción de gas producido durante la fermentación corresponde a este GEI.

La producción total de AGV y la producción de ácido acético fue similar en las gramíneas evaluadas ($p > 0.05$), mientras que *D. swazilandensis* tuvo mayor producción de ácido propiónico ($p < 0.05$) y ácido butírico ($p < 0.05$). La relación acético: propiónico mostró que durante la fermentación de *D. swazilandensis* la pérdida de energía fue menor y se relacionó con la menor producción de CH₄ obtenida (Tabla 5).

La tabla 6, muestra el pH del medio durante 96 h de fermentación. *D. swazilandensis* y *M. maximus* tuvieron el menor pH a las 24, 72 y 96 h de incubación, incluso menor de 6 a la 96 h ($p < 0.05$), además éstos dos pastos tuvieron el pH menor a 6.0 a la hora 96. No hubo diferencia en la concentración de BT entre tratamientos ($p > 0.05$) durante todo el periodo de incubación y la concentración máxima, en todos los tratamientos, fue de 10^9 células ml⁻¹ de medio de cultivo. Respecto a la concentración de bacterias celulolíticas, a las 24 h de incubación, la mayor concentración se observó en *C. nlemfuensis* ($p < 0.05$), a la hora 48 y 72 no hubo diferencia entre tratamientos ($p > 0.05$), mientras que a la hora 96 fue menor ($p < 0.05$) en *C. nlemfuensis* y *D. swazilandensis* (Tabla 7).

Table 7. Concentration of total and cellulolytic bacteria in the culture medium in in vitro incubation.

Hours	<i>C. nlemfuensis</i>	<i>H. rufa</i>	<i>M. maximus</i>	<i>D. swazilandensis</i>	SEM ¹
	<i>Total bacteria</i> 1×10^9				
96	11.6	6.09	2.13	3.53	3.14
72	7.77	4.03	1.26	2.23	3.09
48	5.95	3.08	0.94	1.71	3.08
24	5.14	2.66	0.77	1.35	3.09
	<i>Cellulolytic bacteria</i> 1×10^7				
96	6.74 ^b	19.80 ^a	31.20 ^a	6.50 ^b	2.70
72	4.31 ^a	17.60 ^a	19.90 ^a	4.20 ^a	2.74
48	2.60 ^a	14.50 ^a	12.00 ^b	2.50 ^a	2.24
24	11.10 ^a	1.11 ^b	1.08 ^b	1.08 ^b	2.20

^{a, b, c} Means with different letters in the same row are different ($p < 0.05$)

¹ Standard error of mean.

harvested at 90 days of age, similar results to those found in this study. Maximum methane production was obtained at pH 7.0 to 7.2, and may even occur in the range of 6.6 to 7.6 (3), in this study *D. swazilandensis* showed a lower concentration of cellulolytic bacteria, a pH below 6.5 and therefore a lower concentration of CH₄, due to the reduction of the activity of bacteria that degrade fiber by the pyruvate-lase pathway such as *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Fibrobacter succinogenes* (22,23) and consequently the substrates (CO₂ and H₂) necessary in the formation of CH₄; However, species such as *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinomonas amylolytica* and *Selenomonas ruminantium* proliferate, fermenting soluble carbohydrates and cellulose fragments to produce propionate via succinate (24), which generates a different profile in the production of VFA, producing a higher proportion of propionic acid and therefore less CH₄. On the other hand, the ruminal fermentation of forages with a higher content of cell wall does not cause a significant decrease in pH, because the greater amount of glucose released is fermented by acetate, in this case, the released H₂ can be used as a substrate by methanogenic *archaea*, which is associated with higher production of CH₄ (3), as in the case of *H. rufa* and *C. nlempfuensis*, while with forages that cause low rumen pH, methanogenesis is decreased as in the case of *M. maximus* whose pH was less than 6.5 since 72 hours of incubation and *D. swazilandensis* since 24 hours.

One of the important factors affecting the production of CH₄ is the ratio of produced VFA, specifically the acetic: propionic ratio, which regulates the production and availability of H₂ and subsequent production of CH₄; this ratio can vary from 0.9 to 4 and energy utilization is more efficient if the ratio is close to 1.0 (25). The production of CH₄ has been used as an indicator of the fermentative activity of bacteria in anaerobic fermentation processes (26) in which different groups of bacteria are involved: such as hydrolytic bacteria that fractionate polysaccharides to sugars, VFA formers and methanogenic *archaea* that synthesize CH₄ from H₂ and CO₂ (27,28). Acetate and butyrate originate the production of CH₄, due to the increased availability of CO₂ and H₂ for methanogenic *archaea*, while for propionate formation in the rumen it is considered a competitive form of H₂ uptake that causes a lower synthesis of CH₄ (29). Rumen protozoa produce H₂ as the main end-product of their metabolism and is closely associated as a substrate for methane formation by methanogenic *archaea*. These methanogenic bacteria associated with

DISCUSIÓN

Generalmente las gramíneas presentan un bajo contenido de proteína cruda, con menor contenido de nitrógeno que limita la actividad microbiana en el rumen (20), Avellaneda et al (21), reportan valores de 6.37 y 71.96% de proteína cruda y FDN, respectivamente en pasto Guinea (*Panicum maximum var Mombasa*), cosechado a 90 días de edad, resultados similares a los encontrados en este estudio. La máxima producción de metano se tiene a pH 7.0 a 7.2, e incluso puede producirse en el rango de 6.6 a 7.6 (3), en este estudio *D. swazilandensis*, mostró una menor concentración de bacterias celulolíticas, un pH por debajo de 6.5, y por tanto una concentración de CH₄ menor, esto debido a que se reduce la actividad de las bacterias que degradan fibra por la vía piruvato-formato liasa como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Fibrobacter succinogenes* (22,23) y en consecuencia los substratos (CO₂ y H₂) necesarios en la formación de CH₄, sin embargo, proliferan especies como *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinomonas amylolytica* y *Selenomonas ruminantium* que fermentan los carbohidratos solubles y fragmentos de celulosa para producir propionato vía succinato (24), lo que da un perfil diferente en la producción de AGV, produciendo mayor proporción de ácido propiónico y por tanto menos CH₄. Por otra parte, la fermentación ruminal de forrajes con mayor contenido de pared celular, no causan una disminución significativa del pH, debido a que la mayor cantidad de glucosa liberada se fermenta por la vía acetato, en éste caso, el H₂ liberado puede ser utilizado como sustrato por las *archaeas* metanogénicas, que está asociado con mayor producción de CH₄ (3), como el caso de *H. rufa* y *C. nlempfuensis*, mientras que con forrajes que causan bajo pH ruminal, se disminuye la metanogénesis como el caso de *M. maximus* cuyo pH fue menor de 6.5 desde la hora 72 de incubación y *D. swazilandensis* desde la hora 24.

Uno de los factores importantes que afecta la producción de CH₄ es la relación de AGV producidos, específicamente la relación acético: propiónico, que regula la producción y disponibilidad de H₂ y la subsecuente producción de CH₄; ésta relación puede variar entre 0.9 a 4 y la utilización de la energía es más eficiente si la relación es cercana a 1.0 (25). La producción de CH₄ ha sido utilizado como indicador de la actividad fermentativa de bacterias en procesos de fermentación anaerobia (26) en el que intervienen diferentes grupos de bacterias: como las hidrolíticas que fraccionan los polisacáridos a azúcares, las formadoras de AGV y *arqueas* metanogénicas que sintetizan CH₄ a partir de H₂ y CO₂ (27,28). El acetato y el butirato originan la producción de CH₄, por la mayor disponibilidad de CO₂ y H₂ para las *arqueas* metanogénicas; mientras que para la formación de propionato en el rumen se considera como una forma competitiva en la captación de H₂ que causa una menor síntesis de CH₄ (29). Los protozoarios del rumen producen H₂

rumen protozoa are apparently responsible for 9 to 25% of methanogenesis, but this can be reduced by around 13% when the protozoa are killed; however, this reduction occurs when the animal consumes starchy diets, which is when the protozoa generate more H₂, which is not the case when the diets are high in forage resulting in less methane formation (30). Conversely, a high proportion of acetate: propionate is related to low energy efficiency, which involves higher CH₄ production as was the case with *C. nlempfuensis*, *H. rufa* and *M. maximus*.

In conclusion, the tropical grasses analyzed show a high cell wall concentration, which limits their digestibility and reduces their quality as fodder; however, *Digitaria swazilandensis* showed a lower total production of methane and total gases, possibly due to a higher concentration of propionic acid, lower concentration of cellulolytic bacteria, a pH and a lower acetic:propionic ratio, being the most efficient in energy use.

Acknowledgements

To the National Council of Science and Technology (CONACYT) for financing the project entitled "Estimation and environmental impact of carbon sequestration in oil palm plantations (*Elaeis guineensis* Jacq) in the State of Chiapas", which supported the development of this research work within the guidelines of Scientific Development Projects to Address National Problems (CONACYT/PDCPN2013-01/216526).

como principal producto final de su metabolismo, y este, está estrechamente asociado como sustrato para la formación de metano por *arqueas* metanogénicas. Estas bacterias metanogénicas asociadas con los protozoarios ruminales son aparentemente responsables entre 9 y 25% de la metanogénesis, pero esta puede reducirse alrededor de 13% cuando los protozoarios son eliminados; sin embargo, esta reducción ocurre cuando el animal consume dietas ricas en almidón, que es cuando los protozoarios generan mayor cantidad de H₂, lo que no sucede cuando las dietas son altas en forraje que tiene como consecuencia una menor formación de metano (30). Por el contrario, una alta proporción acetato: propionato está relacionado con baja eficiencia en la utilización de la energía, lo que involucra mayor producción de CH₄ como fue el caso de *C. nlempfuensis*, *H. rufa* y *M. maximus*.

Las gramíneas tropicales analizadas muestran una concentración de pared celular elevada, lo cual limita su digestibilidad y reduce su calidad como forraje, sin embargo, *Digitaria swazilandensis*, mostró una menor producción total de metano y gases totales, posiblemente por una mayor concentración de ácido propiónico, menor concentración de bacterias celulolíticas, un pH y una relación acético:propiónico más baja, siendo la de mayor eficiencia en utilización de la energía.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto intitulado "Estimación e impacto ambiental de la captura de carbono en plantaciones de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq) en el Estado de Chiapas" de donde se apoyó el desarrollo de este trabajo de investigación que se encuentra dentro de los lineamientos de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales (CONACYT/PDCPN2013-01/216526).

REFERENCES

1. Dong LF, Yan T, Ferris CP, Mcdowell DA, Gordon A. Is there a relationship between genetic merit and enteric methane emission rate of lactating Holstein-Friesian dairy cows? *Animal*. 2015; 9(11):1807-1812.
2. Hynes DN, Stergiadis S, Gordon A, Yan T. Effects of concentrate crude protein content on nutrient digestibility, energy utilization, and methane emissions in lactating dairy cows fed fresh-cut perennial grass. *J Dairy Sci*. 2016; 99(11):8858-8866.
3. Zheng Z, Liu J, Yuan X, Wang X, Zhu W, Yang F, et al. Effect of dairy manure to switchgrass co-digestion ratio on methane production and the bacterial community in batch anaerobic digestion. *Appl Energy*. 2015; 151:249-57.
4. Iñamagua-Uyaguari JP, Jenet A, Alarcón-Guerra LG, Vilchez-Mendoza SJ, Casasola-Coto F, Wattiaux MA. Impactos económicos y ambientales de las estrategias de alimentación en lecherías de Costa Rica. *Agron Mesoam*. 2016; 1(27):1-17.

5. Chaokaur A, Nishida T, Phaowphaisal I, Sommart K. Effects of feeding level on methane emissions and energy utilization of Brahman cattle in the tropics. *Agric Ecosyst Environ.* 2015; 199:225-230.
6. Hill J, McSweeney C, Wright ADG, Bishop-Hurley G, Kalantar-zadeh K. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* 2016; 34(1):26-35.
7. Stewart C, Paniagua C, Dinsdale D. Selective isolation and characteristics of *Bacteriodes succinogenes* from the rumen of a cow. *Appl Environ Microbiol.* 1981; 4(2):504-510.
8. Galindo J, Marrero Y, González N, Sosa A. Efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA-25 viables en los metanógenos y metanogénesis ruminal in vitro. *Rev Cuba.* 2010; 44(3):273-279.
9. Appuhamy JADRN, France J, Kebreab E. Models for predicting enteric methane emissions from dairy cows in North America, Europe, and Australia and New Zealand. *Glob Chang Biol.* 2016; 22(9):3039-3056.
10. AOAC. Official Methods of Analysis (19th) Association of Official Analytical Chemists. Arlinton (VA), Washington DC: AOAC; 2012.
11. Van Soest P, Robertson J, Lewis B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991; 74(10):3583-3597.
12. Williams B.A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: D.I. Givens et al., editors, *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International: Wallingford, GBR; 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993447.0000>
13. R. John Wallace, A. Lahlou-Kassi. *Rumen Ecology Research Planning*, Addis Ababa; Ethiopia: 1995.
14. Stolaroff JK, Keith DW, Lowry G V. Carbon Dioxide Capture from Atmospheric Air using Sodium Hydroxide Spray. *Environ Sci Technol.* 2008; 42(8):2728-35.
15. Lin C, Chen B. Carbon dioxide absorption into NaOH solution in a cross-flow rotating packed bed. *J Ind Eng Chem.* 2007; 13(7):1083-1090.
16. Ley de Coss A, Peralta MC. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación in vitro en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Rev Cient FCV-LUZ.* 2011; 21(1):43-49.
17. Ley de Coss A, Arce-Espino C, Cobos-Peralta M. Estudio comparativo entre la cepa de *Pediococcus acidilactici* aislada del rumen de borregos y un consorcio de bacteria ruminales. *Agrociencia.* 2013; 47(6):567-568.
18. Cobos M, Pérez-Sato M, Piloni-Martini J. Evaluation of diets containing shrimp shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Anim Feed Sci Tech.* 2007; 132(3):324-330.
19. SAS. *Statistical Analysis Software, SAS/STAT. Versión 9.3 Edition*. Cary (NC): SAS institute Inc; 2011.
20. Forbes JM, France J. Editors. *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. CAB International, Wallingford, U.K Quant Asp Rumin. 2005.
21. Avellaneda CJH, Montañez-Valdez OD, González-Muñoz S, Pinos-Rodríguez J, Bárcena-Gama R, Hernández-Garay A. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on dry matter and cell wall in vitro digestibility of Guinea grass hay. *J Appl Ani Res.* 2009; 36(2):199-202.
22. Dijkstra J, Ellis JL, Kebreab E, Strathe AB, López S, France J, Bannink A. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Anim Feed Sci Tech.* 2012; 172(1):22-33.
23. Russell JB, Murk RE, Weimer PJ. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen *FEMS Microbiol Ecol.* 2009; 67(2):183-197.
24. Friggens NC, Oldham JD, Dewhurst RJ, Horgan G. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J Dairy Sci.* 1998; 81(5):1331-44.
25. Danielsson R, Dicksved J, Sun L, Gonda H, Müller B, Schnürer A, Bertilsson J. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Front Microbiol.* 2017; 8:A-226.

26. Calsamiglia S, Cardozo PW, Ferret a, Bach a. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J Anim Sci.* 2008; 86(3):702–711.
27. McAllister TA, Newbold CJ. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Anim Prod Sci.* 2008; 48(2):7-13.
28. Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 2010; 4(7):1024-1036.
29. Gidlund H, Hetta M, Krizsan SJ, Lemosquet S, Huhtanen P. (2015). Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *J Anim Sci.* 2015; 98(11):8093-8106.
30. Ranilla MJ, Jouany JP, Morgavi DP. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Lett Appl Microbiol.* 2007; 45(6):675-680.