

Efecto de diferentes niveles de nitrato de calcio sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano en una fermentación ruminal *in vitro* de pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.)

R R Noguera, S L Posada y L Cardona

*Universidad de Antioquia - UdeA, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias - GRICA.
Ciudadela de Robledo, Carrera 75 N° 65-87, Medellín - Antioquia
ricnoguera@gmail.com*

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de niveles crecientes de nitrato de calcio sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano *in vitro*. Los tratamientos consistieron en la incubación de 500 mg de pasto Kikuyo con cuatro niveles de nitrato de calcio (CaNO_3): 0, 3, 6 y 9% con base en la materia seca incubada. Las variables evaluadas fueron producción acumulada de gases, degradación aparente de la materia seca, producción de ácidos grasos volátiles, producción de metano y concentración de nitrógeno amoniacal. El efecto de los nitratos sobre las variables evaluadas se determinó mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo, considerando un modelo mixto, donde los horarios de incubación y los niveles de nitrato fueron efectos fijos y los animales donadores de inóculo se describieron como un efecto aleatorio.

Con 24 horas de incubación, la adición del 6% de nitrato de calcio redujo en un 32% la producción total de gases de la fermentación, en un 17% la degradación de la materia seca y en un 49% la producción de metano con respecto al tratamiento sin nitrato. Las concentraciones de propionato butirato y acetato se redujeron al incrementar el porcentaje de nitrato en el ambiente de fermentación. En este experimento niveles de inclusión de nitrato de calcio superiores al 3% redujeron significativamente la degradación de la materia seca.

Palabras clave: *gases de efecto invernadero, mitigación, nitritos, rumiantes*

Effect of different levels of calcium nitrate on dry matter degradation and methane production in an *in vitro* rumen fermentation of Kikuyu grass

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of increasing levels of calcium nitrate on the *in vitro* dry matter degradation of Kikuyu grass and on methane production. Treatments consisted of incubating 500 mg of Kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus* Chiov Hochst Ex..) with four levels of calcium nitrate (CaNO_3): 0, 3, 6 and 9% (dry matter basis). The variables analyzed were cumulative

gas production, dry matter degradation, methane production and concentration of ammonia and volatile fatty acids. A repeated measures analysis was conducted considering a mixed model, where incubation times and nitrate levels were fixed effects and animal inoculum donors were described as a random effect. With 24 hours of incubation, the addition of 6% calcium nitrate reduced the total gas production (32%), dry matter degradation (17%) and methane production (49%). Concentrations of butyrate, propionate and acetate decreased with increasing the nitrate in the fermentation medium. In this experiment, calcium nitrate above 3% significantly reduced the dry matter degradation.

Key words: *greenhouse gases, mitigation strategies, nitrites, ruminants*

Introducción

Los rumiantes producen cerca de 80 millones de toneladas de metano (CH₄) anualmente, cantidad equivalente al 28% de las emisiones antropogénicas de este gas (Leng 2008). El CH₄ es producido durante la degradación ruminal de carbohidratos y proteínas para producir hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), ácidos grasos volátiles (AGV) y biomasa microbiana. Este proceso fermentativo resulta en una producción elevada de H₂ que necesita ser removido para que el proceso de fermentación y el crecimiento microbiano continúe de manera eficiente (Imming 1996).

Gran parte del H₂ producido en el rumen es removido en forma de CH₄ por las bacterias metanogénicas. Estas bacterias reducen el CO₂ a CH₄ con ayuda de agentes reductores como la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (Beauchemin et al 2008). El CH₄ resultante a partir de la metanogénesis representa una pérdida energética para el animal (Johnson and Johnson, 1995) y se convierte en un problema ambiental por ser un gas con significativo efecto invernadero.

Aceptores de H₂ diferentes al CO₂ han sido propuestos como estrategia para disminuir la síntesis ruminal de CH₄. Estas sustancias incluyen ácidos orgánicos como el fumarato, que a nivel ruminal es reducido a ácido succínico, proceso que consume iones de H₂ en la vía de síntesis de propionato; los sulfatos que son reducidos y utilizados por bacterias sulfato reductoras como aceptores de electrones obteniendo como producto final sulfuro de hidrógeno (H₂S) y finalmente, los nitratos, que pueden remplazar al CO₂ como aceptor de electrones y generar productos reducidos (amonio) diferentes al CH₄ (Leng, 2008). Sin embargo, la utilización de nitratos como fuente de nitrógeno en dietas para rumiantes es limitada, dado que en su proceso de reducción se forman nitritos, que al ser absorbidos a través del epitelio ruminal, pasan a sangre donde se unen a la hemoglobina y generan la condición conocida como metahemoglobinemia, que en algunos casos puede llegar a ser letal.

La dosis mínima letal de nitratos para rumiantes no puede ser fácilmente definida debido a que esta depende de variables como la composición de la dieta, consumo y método de administración (Alaboudi 1985). Las dosis tóxicas para rumiantes varían entre 198 y 998 mg de nitrato /kg de peso vivo (Leng 2008). Sin embargo, los efectos negativos de los nitratos pueden ser reducidos a través de la adaptación gradual de los animales al consumo de esta fuente de nitrógeno y contribuir de esta manera a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de niveles crecientes de nitrato de calcio sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano *in vitro*.

Materiales y métodos

Localización y tratamientos

El experimento se realizó en el laboratorio de nutrición animal NutriLab – GRICA, de la Universidad de Antioquia. Los tratamientos consistieron en la incubación de 500 mg de pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.) con cuatro niveles de nitrato de calcio (CaNO_3) : 0, 3, 6 y 9% con base en la materia seca incubada.

Análisis realizados sobre el forraje

Sobre la muestra de forraje fueron determinadas las concentraciones de cenizas por incineración completa en mufla a 550° C, proteína cruda (PC) (N x 6.25) siguiendo el método de Kjeldahl, materia seca (MS) por secado de la muestra en estufa de ventilación forzada CITATION AOA90 \l 1034 (AOAC, 1990) fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo con el método propuesto por Van Soest et al (1991).

Técnica in vitro de producción de gases (TPG)

Se utilizó la técnica *in vitro* de producción de gases como descrito por Posada y Noguera (2005). La muestra de forraje verde fue secada en horno y molida a través de criba de 1 mm. En frascos individuales con capacidad de 100 ml se pesaron 500 mg de forraje seco para su posterior incubación. El inóculo ruminal se obtuvo de tres vacas Holstein canuladas, las cuales se manejan en un sistema de pastoreo rotacional con pasto Kikuyo y se suplementaban con 1 kg de concentrado/día. Las muestras de digesta, tomadas directamente del rumen a las 0600 h de la mañana, se exprimieron y almacenaron en frascos térmicos a 39° C para su posterior transporte al laboratorio. En el laboratorio, el líquido ruminal de cada animal se filtró a través de cuatro capas de gasa, se sumergió en baño maría a 39° C y continuamente se gaseó con CO_2 para garantizar condiciones de anaerobiosis.

Con el propósito de mantener un adecuado valor de pH durante el proceso de fermentación, se preparó una solución como descrito por McDoougall (1948). En cada frasco de fermentación que contenía la muestra de forraje y el correspondiente nivel de inclusión de CaNO_3 , se adicionaron 45 ml de solución tampón y 5 ml de líquido ruminal. Los frascos fueron gaseados con CO_2 , sellados con tapas de caucho e incubados en estufa de ventilación forzada a 39° C por un periodo de 48 horas. A intervalos regulares, los frascos fueron agitados simulando la actividad ruminal.

Volumen de gas y análisis químico

La presión generada por la acumulación de gas en la parte superior de los frascos de fermentación se midió a las 6, 12, 24 y 48 horas después de la inoculación, con ayuda de un transductor de presión (Ashcroft 2089QG - Precision Digital Test Gauges, USA). Los datos de presión medidos en libras por pulgada cuadrada (PSI) fueron transformados en volumen (ml) (Posada, 2006). El volumen total de gas producido en cada horario de medición se almacenó en bolsas plásticas con sellado hermético para su posterior análisis. Una muestra de 100 μl del gas almacenado se tomó con ayuda de una jeringa gas tight (Restek®, USA) e inyectó en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA) equipado con una columna FAMEWAX (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) (Restek®, USA) y un detector de ionización de llama (FID). Las temperaturas fueron 100° C en la

columna, 250° C en el inyector y 200° C en el detector. El gas de arrastre fue helio (He) y su tasa de flujo fue de 25 ml/min. La concentración de CH₄ fue calculada por calibración externa, utilizando alíquotas de gas CH₄ de composición garantizada (99.9% CH₄) (Linde S.A, Medellín, Colombia) (Lopez y Newbold, 2007). Los cromatogramas fueron integrados utilizando el software ChromQuest versión 5.0 (Thermo Scientific, USA).

Para acompañar el proceso de degradación del sustrato, frascos en los horarios 6, 12, 24 y 48 horas fueron retirados del proceso de incubación y filtrados utilizando crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 – 160 µm). La degradación de la materia seca (MS) fue calculada por diferencia de peso entre el sustrato incubado y el residuo, en el respectivo horario de degradación y expresada como una proporción de la MS incubada. Una muestra (30 ml) del medio de incubación de cada frasco fue tomada y centrifugada (4000 rpm) por 20 minutos para cuantificar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) (acético, propiónico y butírico) por cromatografía gaseosa siguiendo la metodología descrita por Madrid et al (1999).

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los nitratos sobre las variables evaluadas se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo, considerando un modelo mixto, donde los horarios de incubación y los niveles de nitrato fueron efectos fijos y los animales donadores de inóculo se describieron como un efecto aleatorio (Littell et al 1998). Las medias de tratamientos fueron comparadas con ayuda del procedimiento LSMEANS de SAS CITATION SAS03 \l 1034 (SAS, 2003).

Resultados

La composición química del forraje evaluado se describe en la Tabla 1. Las concentraciones para los diferentes constituyentes nutricionales están dentro de los rangos habitualmente reportados para esta especie en la zona norte de Antioquia y el altiplano cundiboyacense en Colombia (Correa et al 2008).

Tabla 1. Composición química pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.) evaluado

Ítem	Concentración g/kg
Materia seca	160
Proteína cruda	200
Fibra detergente neutro	530
fibra detergente ácido	260
Hemicelulosa	270
Celulosa	207.8
Lignina	52.2
Calcio	3.2
Fósforo	4.3

Las variables, volumen de producción de gases de la fermentación (ml/g de MS incubada) y la degradación de la MS (% de la MS incubada) no fueron influenciadas por el nivel de nitrato en las primeras seis horas de incubación (Tabla 2). Las primeras diferencias entre tratamientos se evidencian transcurridas 12 horas de incubación; claramente la adición de nitrato de calcio redujo la producción de gases ($p < 0.05$) aproximadamente en un 36% con respecto al tratamiento sin nitrato. Con 24 y 48

horas de incubación la producción acumulada de gases fue equivalente ($p>0.05$) entre los tratamientos con 0 y 3% de nitrato y superiores a los registrados para los tratamientos con 6 y 9% de nitrato, indicando que niveles de inclusión superiores al 6% de nitrato de calcio afectaron significativamente el proceso fermentativo.

Tabla 2. Producción acumulada de gases *in vitro* y degradación aparente de la MS con diferentes niveles de nitrato a través del tiempo.

Nivel de Nitrato ¹ (%)	Tiempo de incubación (h)	Volumen de gas (ml)	Degradación de la MS (%)
0	6	23.8 a	23.4 a
3	6	18.8 a	23.5 a
6	6	18.3 a	22.0 a
9	6	23.7 a	19.7 a
0	12	62.3 a	35.1 a
3	12	42.4 b	30.6 ab
6	12	36.1 b	28.0 b
9	12	39.4 b	27.3 b
0	24	131.6 a	54.7 a
3	24	123.6 a	53.1 a
6	24	89.9 b	45.5 b
9	24	71.6 b	32.2 c
0	48	209.1 a	60.0 a
3	48	200.4 a	59.5 a
6	48	178.9 b	52.6 b
9	48	134.3 c	41.6 c

¹ Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas entre tratamientos para un mismo horario de incubación ($p<0.05$)

La degradación de la MS fue afectada por el nivel de inclusión de nitrato a partir de las 12 horas de incubación *in vitro*. En este horario, los porcentajes de degradación de los tratamientos con 6 y 9% de nitrato, presentaron una significativa reducción en su degradabilidad con respecto a los tratamientos con 0 y 3% de inclusión ($p>0.05$). Con 24 y 48 horas de incubación, la menor degradación de la MS se registró en el tratamiento con 9% de nitrato, presentando una reducción del 30.7% en la degradación, con respecto al tratamiento con 0% de nitrato después de 48 horas de incubación.

Las concentraciones de AGV (mM/l) no difirieron entre tratamientos durante las primeras 6 horas de incubación *in vitro* (Tabla 3). Sin embargo, la producción acumulada de AGV después de 48 horas de iniciado el proceso de fermentación indica que la producción de acetato y butirato disminuye sustancialmente ($p<0.05$) a partir del 6% de inclusión de nitrato de calcio. El aumento en la participación del nitrato no tuvo efecto sobre la producción de propionato y la relación acetato : propionato, sin embargo se observó una tendencia a la reducción de estos parámetros con la mayor participación del nitrato.

Tabla 3. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) (mM/l) en pasto Kikuyo incubado con niveles crecientes de nitrato de calcio (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.)

Tiempo (h)	AGV	Nivel de inclusión de nitrato de calcio, (%) ¹				ES ²
		0	3	6	9	
6	Acetato	68.6	81.6	82.5	85.7	3.8
	Propionato	32.2	36.5	35.9	34.2	1.0
	Butirato	20.4	21.7	21.2	20.3	0.3
	Total	121.2	139.8	139.6	140.2	4.7
	A:P ³	2.1	2.2	2.3	2.5	0.1
12	Acetato	109.1	100.6	70.2	79.4	9.0
	Propionato	51.4 a	40.6 ab	32.4 b	38.1 ab	4.0
	Butirato	25.6 a	20.9 b	17.9 b	21.2 b	1.6
	Total	186.1	162.1	120.5	138.7	14.2
	A:P	2.1	2.5	2.2	2.1	0.1
24	Acetato	129.8	129.0	139.7	97.8	9.1
	Propionato	67 a	57.1 ab	54.3 ab	41.3 b	5.3
	Butirato	28.8 a	25.4 ab	23.5 bc	17.8 c	2.3
	Total	225.6	211.5	217.5	156.9	15.6
	A:P	1.9	2.3	2.6	2.4	0.1
48	Acetato	176.3 a	184.2 a	138.4 ab	116.3 b	16.0
	Propionato	64.3	65.7	58.5	51.9	3.1
	Butirato	33.7 a	32.6 a	26.8 b	24.9 b	2.2
	Total	274.3	282.5	223.7	193.1	21.2
	A:P	2.7	2.8	2.4	2.2	0.1

¹ letras minúsculas distintas en una misma fila indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) para un mismo horario de incubación.

² ES = error estándar

³ A:P = relación acetato : propionato

Diferencias en la producción de metano (CH₄) solo fueron evidentes a partir de las 12 horas de incubación ruminal (Tabla 4). Claramente la adición de nitrato de calcio en concentraciones superiores al 3%, redujeron significativamente la producción de CH₄ ($p < 0.05$). Después de 48 horas de incubación la reducción en la producción de CH₄ en los tratamientos con 6 y 9% de nitrato de calcio correspondió al 28.3 y 52.4%, cuando comparados con el tratamiento sin nitrato, respectivamente.

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal en el ambiente de fermentación no variaron entre tratamientos a través del tiempo ($p > 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Producción de metano y nitrógeno amoniacal del pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.) incubado con niveles crecientes de nitrato de calcio

Tiempo, horas	Nivel de inclusión de nitrato de calcio (%)				ES
	0	3	6	9	
	<i>Metano, ml/g MS incubada</i>				
6	1.6	1.1	1.1	1.4	0,1
12	4.9 a	1.8 b	1.3 b	1.0 b	0,9
24	9.1 a	10.3 a	3.9 b	1.9 c	2,0
48	13.1 a	10.5 b	8.4 c	4.3 d	1,9
	<i>Metano, ml/g MS degradada</i>				
6	15,2	10,5	11,3	15,7	0.5
12	24.4 a	13.0 b	10.3 b	7,8 b	1.2
24	36.9 a	42.9 a	18.9 bc	13.1 c	3.2
48	48.1 a	40.7 a	34.5 bc	22.9 c	4.3
	<i>Nitrógeno amoniacal, mg/dl</i>				
6	4.7	2.7	4.7	5.7	0.6
12	6.9	7.2	7.5	7.9	1.2
24	5.4 c	7.8 b	10.1 a	12.6 a	1.1
48	10.6 b	11.3 b	11.7 b	15.3 a	1.0

¹ letras minúsculas distintas en una misma fila indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) para un mismo horario de incubación.

Discusión

En los sistemas de fermentación *in vitro*, el volumen de los gases producidos durante el proceso fermentativo es proporcional a la cantidad de MS degradada. La adición de nitrato de calcio en niveles superiores al 3% redujo significativamente la producción total de gases y la degradación de la MS a partir de las 24 horas de incubación (Tabla 2).

La literatura es consistente al indicar que en sistemas de fermentación *in vitro*, la adición de nitratos reduce el volumen de gases producidos durante la fermentación (Ngoc Huyen et al 2010; Inthapanya et al 2011; Binh Phuong et al 2011; Lin et al 2011; Mamvura et al 2014). Explicaciones a este respecto se centran en los efectos tóxicos de los nitratos sobre los microorganismos celulolíticos que pueden reducir la digestibilidad aparente de los forrajes y disminuir la producción de gases (Hall et al 1960). Por otra parte, Marais et al (1988) evaluando el efecto del nitrato y sus productos de reducción sobre el crecimiento y actividad microbiana en sistemas de fermentación *in vitro* con pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.) sostienen que la acumulación de nitritos durante la reducción del nitrato a amonio es la responsable de la menor digestibilidad del sustrato al diezmar las poblaciones de microorganismos celulolíticos y xilanolíticos.

En este sentido, Leng (2008) manifiesta que la suplementación con azufre o cisteína en dietas que contienen nitratos puede reducir la acumulación de nitritos en el rumen y contrarrestar su impacto sobre la degradación de la MS. Este mismo autor relata que en iguales condiciones el Kikuyo y el Ryegrass tienen equiparables contenidos de PC, pero los contenidos de metionina y cisteína del Kikuyo son 68 y 57% menores a los del Ryegrass. Esta condición podría explicar el hecho de que la reducción en la digestibilidad de la MS sea más drástica en el Kikuyo que en el Ryegrass cuando se adicionan nitratos en la dieta. Aparentemente, el metabolismo del nitrato inhibe la conversión del azufre orgánico e inorgánico en el rumen, reduciendo el pool de intermediarios de azufre requeridos por bacterias y hongos celulolíticos para su crecimiento y multiplicación (Gordon y Phillips 1998; Marais 1998). El menor número de estas poblaciones sería el responsable de la reducción en la digestibilidad de la MS, sugiriendo que la suplementación con azufre es requerida cuando los animales sean suplementados con nitratos.

Las concentraciones de propionato, butirato y acetato se redujeron significativamente al incrementar el porcentaje de nitrato en el ambiente de fermentación (Tabla 3). La disminución en las concentraciones de butirato y propionato a partir de las 12 horas de incubación indican que el nitrato fue rápidamente reducido en el medio, consumiendo el hidrógeno (H_2) necesario para la formación de estos ácidos grasos (Li et al 2012). De acuerdo con Ungerfeld y Kohn (2006), la reducción del nitrato es termodinámicamente más favorable que la propiogénesis; siendo así, el nitrato compite con mayor eficiencia por el uso de los átomos de H_2 . Este hecho puede evidenciarse en la Tabla 4, donde las concentraciones de nitrógeno amoniacal aumentaron en función de la adición de nitrato al medio.

La producción de CH_4 fue significativamente reducida con la adición de nitrato (Tabla 4). En condiciones anaerobias el nitrato es reducido a amonio y en este proceso consume 8 hidrógenos, reduciendo así, la disponibilidad de electrones para la síntesis de CH_4 (Leng, 2008). La eficiencia en la captura de electrones por parte del nitrato radica en que el cambio de energía libre para la reducción de nitrato a amonio es de -254 kJ/mol de hidrógeno, en tanto que la energía libre para la formación de CH_4 es de -16.9 kJ/mol de hidrógeno (Ungerfeld and Kohn 2006). En estas condiciones la producción de CH_4 es inhibida hasta tanto todo el nitrato sea reducido a amonio.

Otra explicación para la reducción en la producción de CH_4 en este experimento, radica en la reducción en la degradación de la MS. Menos MS fermentándose implica menor producción de gas, menor producción de AGV y menor producción de metano. Niveles de inclusión de nitrato superiores al 3% podrían tener efectos adversos sobre el consumo, la digestibilidad y la salud animal. Las reducciones en las tasas de degradación del alimento con la utilización de nitratos son asociadas a la acumulación de nitritos que inhiben el sistema transportador de electrones de algunas especies de microorganismos limitando la generación de ATP para su crecimiento (Marais et al 1988).

Reducciones significativas en la emisiones de CH_4 con la adición de nitratos son ampliamente reportadas en la literatura. Estudios *in vitro* relatan disminuciones que varían entre el 42 y 85% (Guo et al 2009; Iv Sophea, 2010; Ngoc Huyen et al 2010; Lin et al 2011; Inthapanya et al 2011; Mamvura et al 2014). La amplia variación en la reducción de las emisiones de CH_4 obedece a la fuente y dosis de nitrato empleada en cada estudio. En este trabajo la reducción en la emisión de metano después de 24 horas de incubación fue de 49 y 64.5% para los tratamientos con 6 y 9% de nitrato, respectivamente (Tabla 4).

Conclusiones

- La producción de metano fue significativamente menor cuando el nitrato fue adicionado al ambiente de fermentación. Sin embargo, niveles de inclusión del 6 y el 9% redujeron la digestibilidad de la MS en un 20%.
-
- Dado que el metabolismo de los nitratos en el rumen interfiere con la disponibilidad de azufre para los microorganismos celulolíticos, la inclusión de este mineral podría ser considerada cuando se incluyan nitratos en la dieta.

Agradecimientos

Este trabajo hace parte del proyecto “Fortalecimiento de la producción de la cadena láctea del distrito Norte Antioqueño”, contrato No. 2013AS180031, financiado con recursos del Sistema General de Regalías – SGR, el Comité para el Desarrollo de la Investigación CODI (Estrategia para la Sostenibilidad 2016 grupo GRICA) y COLCIENCIAS a través del proyecto “Evaluación in-vitro e in-vivo de diversas estrategias nutricionales para mitigar las emisiones de metano y su impacto productivo, reproductivo y económico en ganadería de leche especializada en el norte de Antioquia”.

Bibliografía

Alaboudi R y Jones G A 1985. Effects of Acclimation to High Nitrate Intake on Some Rumen Fermentation Parameters in Sheep. Canadian Journal of Animal Science 65:841-849. <http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/cjas85-099>

Beauchemin K A, Kreuzer M, O'Mara F and McAllister T A 2008 Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture 48, 21-27. https://www.researchgate.net/publication/248892137_Nutritional_management_for_enteric_methane_abatement_A_review

Binh Phuong L T, Preston T R and Leng R A 2011 Mitigating methane production from ruminants; effect of supplementary sulphate and nitrate on methane production in an in vitro incubation using sugar cane stalk and cassava leaf meal as substrate. Livestock Research for Rural Development. Volume 23, Article #22. <http://www.lrrd.org/lrrd23/2/phuo23022.htm>

Correa H J, Pabón M L y Carulla J E 2008 Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. Livestock Research for Rural Development, 20 (4), Article # 59. <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm>

Gordon G L R and Phillips M W 1998 The role of anaerobic gut fungi in ruminants. Nutrition Research Reviews 11: 133-168. http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FNRR%2FNRR11_01%2FS0954422498000109a.pdf&code=b2a93bf34d5195d1ff41ae708a1ef5e1

Guo W S, Schaefer D M, Guo X X, Ren L P and Meng Q X 2009 Use of nitrate-nitrogen as a sole dietary nitrogen source to inhibit ruminal methanogenesis and to improve microbial nitrogen synthesis *in vitro*. Asian Australasian Journal of Animal Science 22:542-549. <http://www.ajas.info/upload/pdf/22-73.pdf>

Hall O G, Gaddy C D and Hobbs C S 1960 Effect of nitrates and nitrite upon forage utilization by rumen microorganisms in vitro and upon ration digestibility by lambs. Journal of Animal Science 19:1305 (Abstract) http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FBJN%2FBJN59_02%2FS0007114588000388a.pdf&code=ec6620c3a9bd82d2b810d4d41529542f

Immig I 1996 The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. Environment Monitoring and Assessment 42: 57–72.

Inthapanya S, Preston T R and Leng R A 2011 Mitigating methane production from ruminants; effect of calcium nitrate as modifier of the fermentation in an in vitro incubation using cassava root as the energy source and leaves of cassava or *Mimosa pigra* as source of protein. Livestock Research for Rural Development. Volume 23, Article #21. <http://www.lrrd.org/lrrd23/2/sang23021.htm>

Iv Sophea 2010 Effect of different ratios of supplementary sodium nitrate replacing urea on growth rates and methane production in goats fed sugar palm-soaked rice straw and mimosa foliage. Proceedings of International

Conference on Live stock production, climate change and resource depletion, Pakse, LAO PDR 9-11 November 2010 (Editors: T R Preston and B Ogle). <http://www.mekarn.org/workshops/pakse/abstracts/sophea.htm>

Johnson K A and Johnson D E 1995 Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73:2483-2492. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/73/8/2483>

Leng R A 2008 The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. A Report to The Department of Climate Change Commonwealth Government of Australia. ACT Canberra Australia For paper and PPT presentation see <http://www.penambulbooks.com>

Li W and Powers W 2012 Effects of saponin extracts on air emissions from steers. *Journal of Animal Science*, 90:4001-4013. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/90/11/4001?search-result=1>

Lin M, Schaefer D M, Guo W S, Ren L P and Meng Q X 2011 Comparisons of *In vitro* Nitrate Reduction, Methanogenesis, and Fermentation Acid Profile among Rumen Bacterial, Protozoal and Fungal Fractions. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 24: 471 – 478. <http://ajas.info/upload/pdf/24-57.pdf>

Littell R C, Henry P R and Ammerman C B 1998 Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* 76:1216-1231. https://www.researchgate.net/publication/13702028_Statistical_Analysis_of_Repeated_Measures_Data_Using_SAS_Procedures

López S and Newbold C J 2007 Analysis of methane. En *FAO-IAEA, H. P. Makkar, & P. Vercoe (Eds.), Measuring methane production from ruminants (10 pp)*. Springer.

Madrid J, Hernández F and Megías M D 1999 Comparison of *in vitro* techniques for predicting digestibility of mixed cereal straw and citrus by-product diets in goats. *Journal Science of Food Agriculture* 79: 567–572. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990315\)79:4%3C567::AID-JSFA220%3E3.0.CO;2-D/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(19990315)79:4%3C567::AID-JSFA220%3E3.0.CO;2-D/epdf)

Mamvura C I, Cho S, Mbiriri D T, Lee H and Choi N J 2014 Effect of Encapsulating Nitrate in Sesame Gum on *In vitro* Rumen Fermentation Parameters. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27: 1577–1583. <http://doi.org/10.5713/ajas.2014.14280>

Marais J P, Therion J J, Mackie R I, Kistner A and Dennison C 1988 Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *British Journal of Nutrition* 59:301-313 http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FBJN%2FBJN59_02%2FS0007114588000388a.pdf&code=0862ade8eb91dbc4e4a6c55bf429b91c

McDougall E I 1948 Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal* 70: 99-109 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1274641&blobtype=pdf>

Ngoc Huyen L T, Do H Q, Preston T R and Leng R A 2010: Nitrate as fermentable nitrogen supplement to reduce rumen methane production. *Livestock Research for Rural Development. Volume 22, Article #146*. Retrieved October 15, 2010, from <http://www.lrrd.org/lrrd22/8/huye22146.htm>

Posada S L y Noguera R R 2005 Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development Volume 17, Article #36*. <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>

Posada S L, Noguera R y Bolívar D 2006 Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19: 407–414. <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/246>

SAS 2003 Statistical Analysis Software Versión 9.1.3. Cary North Carolina, USA.

Ungerfeld E M and Kohn R A 2006 The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress (Eds. K. Sejrsen, T. Hvelplund, and M. O. Nielsen). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp. 55- 85.

Van Soest P J, Robertson J and Lewis B A 1991 Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. Journal of Dairy Science 74: 3583 – 3597. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(91\)78551-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(91)78551-2/pdf)

Received 7 February 2016; Accepted 25 March 2016; Published 1 May 2016