



Evaluación del efecto de *Cymbopogon citratus* sobre el consumo, digestibilidad, emisión de metano y partición de la energía en bovinos en crecimiento

María F. Vázquez-Carrillo , Reynaldo Zaragoza-Guerrero , Luis Corona-Gochi¹ ,
Manuel González-Ronquillo , Epigmenio Castillo-Gallegos² ,
Octavio A. Castelán-Ortega³ 

Laboratorio de investigación en Ganadería, Medio Ambiente y Energías Renovables, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Evaluation of the effect of *Cymbopogon citratus* on consumption, digestibility, methane emission and energy partition in growing cattle

Abstract. Methane (CH₄) produced by enteric fermentation in cattle is of utmost importance as it contributes to greenhouse gas emissions. Reducing CH₄ production would lead to a more efficient use of the gross energy intake (GE_i) increasing animal productivity and reducing CH₄ emissions to the environment. Among the CH₄ mitigation strategies is the addition of plants like *Cymbopogon citratus* (CC) with a high concentration of secondary metabolites like condensed tannins. The aim of the study was to evaluate increasing levels of CC on dry matter intake (DMI), nutrient digestibility (DIG), CH₄ production and GE_i partition in growing cattle fed a 68.6% forage + 31.4% concentrate diet. Four heifers (¾ Holstein × ¼ Charolais) with an average initial live weight of 225 ± 64 kg distributed in a 4×4 Latin square design was used. The experimental treatments were: 1) control diet (CO); 2) CO + 30 g CC DM/d; 3) CO + 60 g CC DM/d and 4) CO + 90 g CC DM/d. Each experimental period consisted of 25 days of adaptation to the treatment and eight days of sampling, the last three days being destined to the quantification of CH₄ emission in open-circuit respiration chambers. A 22.4 % and 21.2 % reduction in CH₄ yield (CH₄ g/kg DMI) and *Y_m* factor respectively was observed with the 30 CC treatment compared to CO (P < 0.05). No differences were observed for DMI, DIG and GE_i partition (P > 0.05). It is concluded that supplementation with 30 g CC DM/d reduces CH₄ yield without affecting animal performance being the same weight gain for all treatments (P>0.05).

Keywords: lemongrass, beef cattle; methane; mitigation; energy partition

Resumen. El metano (CH₄) producido por fermentación entérica de los bovinos es de suma relevancia ya que contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero. Disminuir la producción de CH₄ conllevaría a hacer un uso más eficiente de la energía bruta ingerida (EB_i) aumentando la productividad animal y además se reducirían las emisiones de CH₄ hacia el medio ambiente. Dentro de las estrategias de mitigación de CH₄ se encuentra la adición de plantas como *Cymbopogon citratus* (CC) con alta concentración de metabolitos secundarios como taninos condensados. El objetivo del estudio fue evaluar niveles crecientes de CC sobre el consumo de materia seca (CMS), digestibilidad de nutrientes (DIG), producción de CH₄ y partición de EB_i en ganado bovino en crecimiento alimentado con una dieta 68.6% forraje + 31.4% concentrado. Se utilizaron cuatro becerras (¾ Holstein × ¼ Charolais) con un peso vivo inicial de 225 ± 64 kg distribuidos en un diseño de cuadrado latino 4×4. Los tratamientos experimentales fueron: 1) dieta control (CO); 2) CO + 30 g CC MS/d; 3) CO + 60 g CC MS/d y 4) CO + 90 g CC MS/d. Cada periodo experimental

¹ Departamento de Nutrición Animal y Bromatología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

² Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

³ Autor para la correspondencia: oacastelano@uamex.mx

consistió en 25 días de adaptación al tratamiento y ocho días de muestreo, siendo los últimos tres días destinados a la cuantificación de la emisión de CH₄ en cámaras de respiración de circuito abierto. Se observó una reducción del 22.4 % y 21.2 % en el rendimiento de CH₄ (CH₄ g/kg CMS) y factor Y_m, respectivamente, con el tratamiento 30 CC comparado con CO (P<0.05). No se observaron diferencias para el CMS, DIG y partición de EBi (P > 0.05). Se concluye que la suplementación con 30 g CC MS/d reduce el rendimiento de CH₄ sin afectar el desempeño productivo animal, siendo la misma ganancia de peso para todos los tratamientos (P > 0.05)

Palabras clave: té limón, metano, partición de la energía, bovinos, mitigación

Avaliação do efeito de *Cymbopogon citratus* no consumo, digestibilidade, emissão de metano e partição de energia em bovinos em crescimento

Resumo. O metano (CH₄) produzido pela fermentação entérica de bovinos é de extrema relevância, pois contribui para a emissão de gases de efeito estufa. Reduzir a produção de CH₄ levaria a um uso mais eficiente da energia bruta ingerida (EBi), aumentando a produtividade animal e também reduzindo as emissões de CH₄ no meio ambiente. Entre as estratégias de mitigação de CH₄ está a adição de plantas como *Cymbopogon citratus* (CC) com alta concentração de metabólitos secundários como taninos condensados. O objetivo do estudo foi avaliar níveis crescentes de CC sobre o consumo de matéria seca (CMS), digestibilidade dos nutrientes (DIG), produção de CH₄ e partição de EBi em bovinos em crescimento alimentados com uma dieta de 68,6% de forragem + 31,4% de concentrado. Foram utilizados quatro bezerras (¾ Holandês × ¼ Charolais) com peso vivo inicial de 225 ± 64 kg distribuídos em quadrado latino 4 × 4. Os tratamentos experimentais foram: 1) dieta controle (CO); 2) CO + 30 g CC MS/d; 3) CO + 60 g CC MS/d e 4) CO + 90 g CC MS/d. Cada período experimental consistiu em 25 dias de adaptação ao tratamento e oito dias de amostragem, sendo os últimos três dias dedicados à quantificação da emissão de CH₄ em câmaras de respiração de circuito aberto. Uma redução de 22,4% e 21,2% no rendimento de CH₄ (CH₄ g/kg CMS) e fator Y_m, respectivamente, foi observada com o tratamento de 30 CC em comparação com CO (P<0,05). Não foram observadas diferenças para a partição CMS, DIG e EBi (P > 0,05). Conclui-se que a suplementação com 30 g CC MS/d reduz o rendimento de CH₄ sem afetar o desempenho produtivo animal, com o mesmo ganho de peso para todos os tratamentos (P > 0,05).

Palavras-chave: chá de limão, metano, particionamento de energia, gado, mitigação

Introducción

El CH₄ es uno de los subproductos que resulta de la fermentación de los carbohidratos del alimento ingerido por el rumiante. El CH₄ representa una pérdida energética para el animal, que puede llegar a representar hasta el 12 % del total de la energía bruta ingerida (EBi) (Johnson y Johnson 1995). El CH₄ es de suma relevancia ya que el ganado lo produce en grandes volúmenes aunado a que es un gas de efecto invernadero (GEI) que contribuye al cambio climático. El CH₄ tiene un potencial de calentamiento global 28 veces más potente que el CO₂ y con una vida en la atmósfera de 9 a 15 años (Eckard *et al.* 2010). En este sentido, el reducir las emisiones de CH₄ entérico podría apreciarse en corto-mediano plazo.

A nivel mundial, las emisiones de CH₄ entérico representan alrededor del 3 al 5% de las emisiones totales de GEI (Smith *et al.* 2014). México, en el año 2019, contribuía con 2039.21 ± 205.5 Gg CH₄ producido por fermentación entérica (Castelán-Ortega *et al.* 2019) de una población de casi 32 millones cabezas de ganado bovino registradas por el Padrón Ganadero Nacional en el 2016.

El estudio del metabolismo y de la partición de la EBi por el bovino, ofrecen la posibilidad de manipular la fermentación ruminal mediante la modificación de la dieta, como vía para incrementar la eficiencia energética, reduciendo las pérdidas de energía como el CH₄, lo cual se traduciría en una mayor producción de producto cárnico o lácteo (Zhang *et al.* 2021).

Actualmente, existen diferentes estrategias de mitigación de CH₄, dentro de las cuales destaca la adición de compuestos naturales y amigables con el medio ambiente, como la adición de plantas con alta concentración de metabolitos secundarios como taninos condensados. Estos metabolitos secundarios se caracterizan por actuar directa o indirectamente sobre los microorganismos ruminales suprimiendo la producción de CH₄ (Ku-Vera *et al.* 2020). *Cymbopogon citratus* es una gramínea tropical perene, cultivada a nivel mundial, su composición fitoquímica comprende: fenoles, saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides, antraquinonas y diversos aceites esenciales (Haque *et al.* 2018).

Pocos son los estudios que se han realizado evaluando su potencial antimetanoagénico en ganado bovino, recientemente nuestro equipo de trabajo encontró que con la inclusión de 100g MS/d disminuía el rendimiento de CH₄ en un 33%, y en un segundo estudio evaluando niveles crecientes (0, 2, 3 y 4%) encontramos que a partir de la inclusión del 2 y 3% en la dieta disminuía la producción diaria en un 26%, sin embargo, se observó

una disminución en la digestibilidad de nutrientes de la dieta. Es por lo anterior que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de niveles crecientes de CC, pero menores a los estudios previos, sobre la producción de CH₄, el consumo de materia seca (CMS), digestibilidad de nutrientes y partición de la energía bruta consumida en ganado bovino en crecimiento, alimentado con una dieta alta en forraje.

Materiales y Métodos

Localización.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ganadería, Medio Ambiente y Energías Renovables de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en Toluca, Estado de México a una latitud norte de 19 24' 15", longitud oeste de 99, 41' 06", y a una altura de 2632 msnm.

Animales y periodos experimentales.

Se utilizaron cuatro novillas (¾ Holstein × ¼ Charolais) de 225 ± 64 kg peso vivo (PV) promedio inicial, distribuidos en un diseño completamente al azar 4×4. El uso de animales en el experimento fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación, protocolo DC2018/2-8 de la Universidad Nacional Autónoma de México. El experimento tuvo una duración de 180 días. Los primeros 31 días se dedicaron a la adaptación general de los animales a la dieta, instalaciones y manejo. Los 150 días restantes se dividieron en cuatro periodos experimentales de 33 días cada uno, con un periodo de lavado de 7 días entre cada uno. Cada periodo se dividió en 25 días de adaptación al tratamiento experimental y ocho días de medición. Los animales fueron alimentados a las 10 y 17 h; se pesaron semanalmente, y al principio y al final de cada periodo experimental. Durante el periodo de muestreo se midió el CMS y la producción total de heces. Los últimos tres días del periodo de muestreo se cuantificó la emisión de CH₄ en cámaras de respiración de circuito abierto por 72 horas. Simultáneamente se midió el CMS, producción total de heces y orina.

Tratamientos experimentales.

Se evaluaron cuatro tratamientos: 1) dieta control (CO), 2) CO + 30 g CC MS/día (30 CC), 3) CO + 60 g CC MS/día (60 CC), y 4) CO + 90 g CC MS/día (90 CC). La CO consistió en una TMR ofrecida *ad libitum* formulada acorde a los requerimientos de energía y proteína metabolizable de los animales según el AFRC (1993). La CO estaba compuesta por un 7.3% de heno de alfalfa, 61.3% de heno de avena, 3.0% de harina de soya, 10.2% de maíz molido, 12.4% de galleta de trigo y 5.8% de salvado de trigo.

Análisis químicos de muestras.

Las muestras se procesaron en un molino con criba de 1 mm. Se determinó contenido de materia seca (MS, %), cenizas (CEN, %), proteína bruta (PC = [N] × 6.25%) por el método Kjeldahl, energía bruta con una bomba calorimétrica Parr (EB, MJ/d) fibra detergente neutro (FDN, %) y fibra detergente ácido (FAD, %) (VanSoest 1991). La concentración total de fenoles de CC se determinó acorde al procedimiento de Folin-Ciocalteu, el contenido de taninos por el método de polivinilpirrolidona (Makkar *et al.* 1993) y el contenido de taninos condensados por el método de vainillina (Price *et al.* 1978) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de tratamiento control y contenido de fenoles, taninos totales y condensados de *Cymbopogon citratus*.

Variable	Dieta control
MS, g/ kg	942.7 ± 2.0
PC, g kg/ MS	93.51 ± 0.58
FC, g kg/ MS	264.3 ± 1.8
FDN, g kg/ MS	491.3 ± 16.8
FDA, g kg/ MS	306.1 ± 7.2
TND, g kg/ MS	817.8 ± 24.8
MO, g kg/ MS	912.3 ± 28.3
EB, MJ/ kg MS	16.2 ± 0.14
<i>C. citratus</i>	
FT, g/kg DM	7.8
TT, g/kg DM	4.4
TC, g/kg DM	44.5

MS=materia seca; FDN=fibra detergente neutro; FDA=fibra detergente ácido; PC=proteína cruda; TND=total nutrientes digestibles; MO=materia orgánica; EB=energía bruta; FT=fenoles totales; TT=taninos totales; TC=taninos condensados.

La determinación de la partición de la energía bruta ingerida (EBi) fue estimada a partir de la EB de la MS ingerida, heces (Eh), orina (Eu) y metano (ECH₄). El valor calorífico de la producción total de CH₄ por animal (MJ/d) se determinó asumiendo que 1 g de CH₄ equivale a 55,5 KJ (Brouwer 1965). A partir del contenido de

nitrógeno en la orina se estimó la energía según Street (1964). La energía digestible ingerida (EDi) fue la diferencia de la EBi menos la Eh y la energía metabolizable ingerida (EMi) fue resultado de la EDi menos la Eu y ECH₄. El factor de conversión CH₄ (Y_m , %) se calculó como el porcentaje de la ingesta de energía bruta convertida en CH₄ (IPCC 2006). La metabolizabilidad de la dieta (qm) se calculó según AFRC (1993).

Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron mediante análisis de la varianza con el siguiente modelo lineal y aditivo para un

diseño experimental de cuadrado latino:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + T_j + P_k + \varepsilon_{ijkl}$$

donde: Y_{ijkl} es la variable respuesta del i -ésimo animal ($i=1, 2, 3, 4$), que recibió el j -ésimo tratamiento ($j=1, 2, 3, 4$) durante el k -ésimo periodo ($k=1, 2, 3, 4$), μ es la media general común a todas las observaciones, A_i es el efecto aleatorio del animal, T_j es el efecto fijo del tratamiento, P_k es el efecto fijo del periodo y ε_{ijk} es el error experimental común a todas las observaciones, supuesto independiente, distribuido normalmente, con media cero y varianza unitaria ($N, I; \mu = 0, \sigma = 1$). El análisis estadístico se realizó con el software R v.1.3.1073.

Resultados y Discusión

En el Cuadro 2 se muestran todos los resultados obtenidos en el presente estudio. La suplementación con 30 g de CC MS/animal/d redujo el rendimiento de CH₄ (g/kg CMS) y el factor Y_m en un 22% y un 21%, respectivamente, en comparación con la dieta CO ($P < 0.05$). Estos resultados son comparables con los observados por Vázquez-Carrillo *et al.* (2020) con una reducción de 33% en el rendimiento de CH₄ debida a la inclusión de 100 g de CC MS/animal/d con respecto a su dieta control en ofrecida a bovinos alimentados con una dieta alta en concentrado; en un segundo estudio realizado por los mismos autores observaron una reducción de la emisión total diaria de CH₄ (CH₄, g/d/animal) del 26% con niveles crecientes de inclusión de CC 280 y 411 g CC MS/animal/d, correspondiente al 2 y 3% del consumo, en comparación con su dieta control (una dieta alta en forraje).

Por otro lado, el rendimiento de CH₄ observado en el presente trabajo para la dieta CO es similar al valor promedio referido por Van Lingen *et al.* (2019) (20.7 g/kg MS) derivado de un meta-análisis para animales alimentados con dietas altas en forraje. Esta similitud en el rendimiento de CH₄ para la dieta CO sugiere que el menor rendimiento encontrado con el tratamiento 30 CC puede atribuirse a la inclusión de CC en la dieta ($P < 0.05$).

Igualmente, la reducción del factor Y_m y la relación CH₄:GE, con el tratamiento 30 CC sugiere que la energía no perdida en forma de CH₄ podría haberse canalizado hacia la GDP de los animales, contribuyendo a reducir las emisiones de este GEI al medio ambiente.

Existen diversas teorías del efecto de los metabolitos secundarios sobre la reducción de metano, específicamente de los taninos condensados, los cuales pueden actuar de forma directa suprimiendo a las arqueas metanogénicas e indirectamente interfiriendo en la estrecha simbiosis entre protozoarios ciliados y arqueas metanogénicas, reduciendo o inhibiendo de la transferencia de H₂ afectando a dichas poblaciones (Guyader *et al.* 2014; Naumann *et al.* 2017). También se plantea una inhibición indirecta del crecimiento microbiano al disminuir la disponibilidad de nutrientes por privación de sustrato, inhibición enzimática o como agentes quelantes, disminuyendo la adherencia de los microorganismos del rumen a las paredes celulares de las plantas e inhibiendo las enzimas fibrolíticas como las hemicelulasas y las celulasas (Frutos *et al.* 2004). Lo anterior sugiere que la actividad antimetanogénica del CC pudo deberse a la inhibición directa de las arqueas metanogénicas, dado que no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las digestibilidades de FDN y FDA (Cuadro 2).

Conclusiones

La inclusión de 30 g CC MS/día/animal redujo el rendimiento de CH₄ de las novillas utilizadas en el presente estudio sin afectar el CMS, digestibilidad de

nutrientes, partición de la EBi, ni el crecimiento de los animales.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT-223418), de la Universidad Autónoma del

Estado de México (6511/2022 CIB). Y a CONACYT por la beca de estudios de doctorado proporcionada a la primera autora.



Cuadro 2. Consumo, digestibilidad de nutrientes, emisión de metano y partición de la energía bruta consumida de novillas suplementadas con niveles crecientes de *C. citratus*.

Variable	Tratamiento				SEM	Valor P
	CO	30 CC	60 CC	90 CC		
Consumo, kg/d						
CMS	9.23	8.86	9.48	8.22	0.54	0.444
FDN	4.49	4.35	4.63	4.06	0.27	0.531
FDA	2.81	2.71	2.89	2.53	1.16	0.498
PC	0.86	0.83	0.89	0.77	0.51	0.449
MO	8.41	8.09	8.60	7.51	0.51	0.505
EB (MJ/d)	149.50	143.70	153.50	133.40	8.83	0.464
Digestibilidad, %						
MS	60.09	60.40	64.12	58.98	2.22	0.449
FDN	52.60	53.98	57.07	51.78	3.52	0.736
FDA	51.33	51.78	56.95	49.66	3.61	0.556
MO	64.12	64.17	67.84	62.88	2.08	0.431
PC	58.79	56.39	60.23	59.09	2.84	0.809
EB	61.82	63.49	66.92	61.78	2.41	0.449
Emisión de metano						
CH ₄ g/d	184.50	144.30	152.50	146.30	12.48	0.182
CH ₄ g/kg CMS	20.81 ^a	16.15 ^b	16.90 ^{ab}	18.04 ^{ab}	0.87	0.037
GDP, kg/d	0.70	1.01	1.00	0.83	0.14	0.428
CH ₄ g/kg GDP	268.80	150.70	199.60	257.30	48.47	0.365
Ym Factor, %	7.02 ^a	5.53 ^b	5.74 ^{ab}	6.11 ^{ab}	0.30	0.047
Partición de la energía bruta consumida						
Energía en heces, MJ/d	57.53	52.38	47.78	50.09	3.36	0.299
Eh:EB	0.38	0.37	0.33	0.38	0.02	0.424
Energía en orina, MJ/d	2.87	3.46	4.26	4.09	0.40	0.161
Eu:EB	0.020	0.025	0.025	0.030	0.004	0.455
Energía en CH ₄ , MJ/d	10.19	7.97	8.42	8.08	0.69	0.182
CH ₄ :EB	0.070 ^a	0.055 ^b	0.057 ^{ab}	0.061 ^{ab}	0.003	0.041
EBi, MJ/d	149.5	143.7	153.5	133.4	8.83	0.464
EDi, MJ/d	92.01	91.37	105.69	83.32	8.45	0.385
EMi, MJ/d	78.95	79.95	93.02	71.15	7.75	0.339
ED:EB	0.62	0.64	0.67	0.62	0.02	0.424
EM:EB	0.53	0.56	0.59	0.53	0.02	0.265
EM:ED	0.86	0.88	0.88	0.86	0.01	0.162

CO=dieta control; 30CC= CO + 30 g CC DM/d; 60CC= CO + 60 g CC DM/d; 90CC=CO + 90 g CC DM/d; CMS=consumo de materia seca; FDN=fibra detergente neutro; FDA=fibra detergente ácido; PC=proteína cruda; MO=materia orgánica; EB=energía bruta; GDP=ganancia diaria de peso; ED=energía digestible; EM=energía metabolizable; Eh=energía en heces; Eu=orina; EBi=energía bruta ingerida; EDi=energía digestible ingerida; EMi=energía metabolizable ingerida; Eh:EB=proporción Eh:EB; proporción Eu:EB; ED:EB=proporción ED:EB; EM:EB=proporción EM:EB; EM:ED= proporción EM:ED. SEM = Error estándar de la media. Valores en la misma fila con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Conflicto de intereses: Los autores manifiestan que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

Literatura Citada

- AFRC. Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisory Manual Prepared by the Agricultural Food and Research Council Technical Committee on Responses to Nutrients. CAB International: UK, 1993; 176.
- Brouwer E. Report of sub-committee on constants and factors. In: Energy metabolism of farm animals. Proceedings of the 3rd Symposium on Energy Metabolism, Blaxter K.L., Ed. Academic Press: London, 1965, 441-443.



- Castelán-Ortega, O. A., J. C. Ku-Vera, J. C. Ángeles-Hernández, M. Benaouda, G. S. Hernández-Pineda, T. L. Molina, L. Ramírez-Cancino, S.V. Castelán-Jaime, A. R. Praga-Ayala, F. Lazos-Balbuena, H. Montelongo-Pérez, M. González-Ronquillo, M. F. Vázquez-Carrillo, E. Cardoso-Gutiérrez, E. Aranda-Aguirre, D. Villegas-Estrada, A. P. Guadarrama-López y G. Apodaca-Martínez. 2019. Ganadería. Capítulo 22. pp. 492- 528. En: Paz-Pellat, F., J. M. Hernández-Ayón, R. Sosa-Ávalos y A. S. Velázquez-Rodríguez (eds.). 2019. Estado del Ciclo del Carbono en México: Agenda Azul y Verde. Programa Mexicano del Carbono. Texcoco, Estado de México, México. ISBN: 978-607-96490-7-4.
- Eckard RJ, Grainger C, De Klein CAM. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livest Sci* 2010; 130:47-56. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.02.010.
- Frutos P.; Hervás G.; Giráldez F.J.; Mantecón A.R. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2004, 2, 191-202. DOI:10.5424/sjar/2004022-73
- Guyader J.; Eugène M.; Nozière P.; Morgavi D.P.; Doreau M.; Martin C. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal* 2014, 8, 1816-1825; DOI: 10.1017/S1751731114001852.
- Haque A.N.M.A.; Remadevi R.; Naebe M. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. *Cellulose* 2018, 25, 5455–5477; DOI: 10.1007/s10570-018-1965-2
- IPCC. Dong H.; Joe Mangino J.; McAllister A.T.; Hatfield L.J.; Johnson E.D.; Lassey R.K.; de Lima A.M. Romanovskaya A. Chapter 10: Emissions from Livestock and Manure Management. In: IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories Programme, Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T., Tanabe K. Eds.; IGES, Japan. 2006; 4, 10.1-10.87
- Johnson K.A.; Johnson D.E. Methane emission from cattle. *J Anim Sci* 1995, 73, 2483-2492; DOI: 10.2527/1995.7382483x
- Ku-Vera J.C.; Jiménez-Ocampo R.; Valencia-Salazar S.S.; Montoya-Flores M.D.; Molina-Botero I.C.; Arango J.; Gómez-Bravo C.A.; Aguilar-Pérez C.F.; Solorio-Sánchez F.J. Role of Secondary Plant Metabolites on Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 2020, 7, 584; DOI: 10.3389/fvets.2020.00584
- Makkar H.P.S.; Blümmel M.; Borowy N.K.; Becker K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 61, 161–165; DOI: [10.1002/jsfa.2740610205](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740610205)
- Naumann H.D.; Tedeschi L.O.; Zeller W.E.; Huntley N.F. The role of condensed tannins in ruminant animal production: Advances, limitations and future directions. *Rev. Bras. Zootec.* 2017, 46, 929–949; DOI:10.1590/s1806-2902017001200009.
- Price, M.L.; Van Scoyoc, S.; Butler, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agr. Food Chem.* 1978, 26, 1214–1218; DOI: [10.1021/jf60219a031](https://doi.org/10.1021/jf60219a031)
- Smith P.; Bustamante M.; Ahammad H.; Clark H.; Dong H. Agriculture, forestry and other land use (AFOLU). In: Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Edenhofer O.; Pichs-Madruga R.; Sokona Y.; Minx J.C.; Farahani E.; Kadner S.; Seyboth K., et al. Eds.; Cambridge University Press: United Kingdom and New York, NY, USA, 2014; pp 811-922.
- Street C.J.; Butcher E.J.; Harris E.L. Estimating Urine Energy from Urine Nitrogen. *J. Anim. Sci.* 1964, 23, 1039-1041; DOI: [10.2527/jas1964.2341039x](https://doi.org/10.2527/jas1964.2341039x)
- van Lingen H.J.; Niu M.; Kebreab E.; Valadares F.S.C.; Rooke J.A.; Duthie C.-A.; Schwarm A.; Kreuzer M.; Hynd P.I.; Caetano M.; Eugène M.; Martin C.; McGee M.; O’Kiely P.; Hünerberg M.; McAllister A.T.; Berchielli T.T.; D.Messana J.; Peiren N.; Chaves V.A.; Charmley E.; cole A.N.; Hales E.K.; Lee S-S.; Berndt A.; Reynolds C.K.; Crompton A.L.; Bayat R-A.; Yáñez-Ruiz R.D.; [Yu Z.](#); [Bannink A.](#); Dijkstra J.; Casper P.D.; Hristov N.A. Prediction of enteric methane production, yield and intensity of beef cattle using an intercontinental database. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2019, 283, 106575; DOI: [10.1016/j.agee.2019.106575](https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106575)
- Van Soest P.J.; Robertson J.B.; Lewis B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991, 74, 3583–3597; DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vázquez-Carrillo M.F.; Montelongo-Pérez H.D.; González-Ronquillo M.; Castillo-Gallegos E.; Castelán-Ortega O.A. Effects of Three Herbs on Methane Emissions from Beef Cattle. *Animals* 2020, 10, 1671; DOI: 10.3390/ani10091671
- Zhang X.M.; Smith L.M.; Gruninger J.R.; Kung L.; Vyas D.; McGinn M.S.; Kindermann M., [Liang T.Z.](#); [Beauchemin K.](#) Combined effects of 3-nitrooxypropanol and canola oil supplementation on methane emissions, rumen fermentation and biohydrogenation, and total tract digestibility in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2021, 99, 1-10; DOI: 10.1093/jas/skab081

