

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y DINÁMICA DE LA
MICROBIOTA RUMINAL *IN VITRO***

POR:

M.V.Z. ALEJANDRO CASTAÑEDA CORREA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN NUTRICIÓN ANIMAL



Parámetros de fermentación ruminal y dinámica de la microbiota ruminal *in vitro* bajo la influencia de timol y carvacrol. Tesis presentada por Alejandro Castañeda Correa como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo
Secretaria de Investigación y Posgrado

D. Ph. Agustín Corral Luna
Coordinador Académico

D. Ph. Agustín Corral Luna
Presidente

Noviembre 07 - 2016

Fecha

Comité:

D. Ph. Agustín Corral Luna
Ph. D. Héctor Gutiérrez Bañuelos
Ph. D. Felipe A. Rodríguez Almeida
Ph. D. Oscar Ruíz Barrera

© Derechos Reservados
ALEJANDRO CASTAÑEDA CORREA
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO
R. ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453
NOVIEMBRE 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

A la Facultad de Zootecnia y Ecología, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por aceptarme en el programa de Maestría.

Al **D.Ph. Agustín Corral Luna** por brindarme su apoyo como asesor, profesor y amigo.

Al **Ph.D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida**, por su apoyo esencial durante el proceso de realización de mi programa de maestría.

A los **equipos de trabajo de la Secretaría de Investigación y Posgrado** y del **Laboratorio de Nutrición Animal** por su amistad, atenciones y servicios.

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres,

Hortencia Correa Carlos y Toribio Castañeda Castañeda, por su amor y paciencia. Ustedes son mi motivación de vida.

A mis hermanos,

Verónica, Angélica y Lucio Castañeda Correa.

A mis abuelitos, tíos, primos y a mi sobrina.

A mi novia,

Ahtziri Zulueth Casillas Campos.

A mis amigos,

Dani, Cheko, Pepe, Alan, Martha, Ramón, Said, Viri, Raúl, Arras, George, Dr. Ivan, Mika, Ana Karen, Paty, Oli, Iveth, Pablo, Gera, Richard, Tavo y Hortencia.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 10 de septiembre de 1987, en el municipio del Teúl de González Ortega, Zacatecas, México.

- | | |
|----------------|---|
| 2007 – 2012 | Estudios de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas. |
| Ago – Dic 2011 | Estancia profesional en el área de bovinos productores de leche del Campo Experimental Rancho Cofradía. Universidad de Guadalajara. |
| Ene – May 2012 | Estancia profesional en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. |
| 2012 – 2014 | Estudiante del programa de Maestría en Ciencias con área mayor en Nutrición Animal. Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. |
| Jun – Sep 2014 | Estancia de investigación en el Centro de Investigación USDA-ARS, Food and Feed Safety Research Unit. College Station, TX, EUA. |

RESUMEN

PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y DINÁMICA DE LA MICROBIOTA RUMINAL *IN VITRO* BAJO LA INFLUENCIA DE TIMOL Y CARVACROL

POR:

M.V.Z. Alejandro Castañeda Correa

Maestría en Ciencias

Secretaría de Investigación y Posgrado

Área Mayor: Nutrición Animal

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D.Ph. Agustín Corral Luna

Dos aceites esenciales (AE), timol (T) y carvacrol (C), fueron usados en seis proporciones (100:00, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 00:100), a una dosis de 0.2 g·L⁻¹ de medio de cultivo, para evaluar su efecto sobre la producción total de gas (PTG), metano (CH₄), degradabilidad *in vitro* de la MS (DIVMS), dinámica poblacional de bacterias metanogénicas y bacterias totales del rumen bovino en condiciones *in vitro*. Para evaluar estas variables, se realizó una incubación utilizando medio ruminal bovino por 24 h. Al finalizar la incubación, se determinó la PTG, CH₄ y DIVMS. Los resultados finales de estas tres variables fueron desviados con respecto al control para obtener el porcentaje de cambio debido al tratamiento. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN de los microorganismos ruminales, se realizó la PCR-DGGE y se analizó la dinámica

de las poblaciones de bacterias ruminales. De manera general, el tratamiento con la mayor concentración de T provocó una mayor tasa de cambio en la producción de CH₄, y se observó una tendencia a disminuir linealmente conforme la concentración de T se redujo en el AE. Se observó que la población de bacterias totales mostró una ligera variación en su estructura ($D_{sc}=88.1$), el cual indica la similitud entre una muestra tomada con respecto a una muestra de referencia. No se observaron efectos sobre la PTG, DIVMS y población de bacterias metanogénicas ($D_{sc}=96.1$). El T fue el compuesto que mayor efecto mostró sobre producción de CH₄ y modificando ligeramente las poblaciones de bacterias totales. Sin embargo, no afecta la PTG, la DIVMS y las poblaciones de bacterias metanogénicas.

ABSTRACT

RUMINAL FERMENTATION PARAMETERS AND RUMINAL MICROBIOTA DYNAMICS *IN VITRO* UNDER THE INFLUENCE OF THYMOL AND CARVACROL

By:

M.V.Z. Alejandro Castañeda Correa

Two essential oils (EO), thymol (T) and carvacrol (C) were used in six ratios (100:00, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 and 00:100) to a dose of 0.2 g·L⁻¹ of media to evaluate its effect on total gas production (TGP), methane (CH₄), *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), and population dynamics of methanogenic bacteria and total bacteria under *in vitro* conditions. The incubation was carried out using bovine ruminal media for 24 h. After this, TGP, CH₄ and IVDMD were evaluated. Then, DNA was extracted from ruminal microorganisms and PCR-DGGE was performed. Finally, bacterial population dynamics from rumen was analyzed. Generally, the addition of T and C decreased ($P < 0.05$) linearly CH₄ production, as the concentration of C was incremented. It also was observed that the population of total bacteria showed a slight variation in structure ($D_{SC} = 88.1\%$), which indicates the similarity between a taken sample relative to a reference sample. However, no effects were observed in TGP, IVDMD and methanogenic bacteria populations ($D_{SC} = 96.1\%$). The influence of T and C in a 0.2 g·L⁻¹ dose decrease linearly methane production and modifies total bacterial populations. However, it does not affect TGP, IVDMD and methanogenic populations.

CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Gases con Efecto Invernadero.....	3
Efecto Invernadero.....	4
Metanogénesis Ruminal.....	6
Factores que Influyen en la Metanogénesis Ruminal.....	7
Estrategias para Mitigar la Producción de CH ₄ Entérico.....	9
Inoculación ruminal de bacterias acetogénicas.....	9
Compuestos no Naturales.....	10
Nitrocompuestos.....	10
Compuestos Naturales.....	11
Ionóforos.....	11
Aceites esenciales.....	13
Taninos y saponinas.....	18
Ácidos orgánicos.....	20
Importancia del Estudio del Timol y Carvacrol en Diferentes Proporciones.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Líquido Ruminal.....	22
Medio Ruminal.....	22
Diseño Experimental.....	23
Tratamientos.....	23
Variables de Fermentación Evaluadas.....	24
Producción total de gas (PTG).....	24

Composición de gas.....	24
Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	24
Evaluación de la Diversidad de la Microbiota.....	26
Extracción de ADN genómico.....	26
Cuantificación de ADN.....	27
Amplificación de ADN por PCR.....	27
Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).....	28
Análisis Estadístico.....	29
Análisis de la Diversidad Microbiana por DGGE.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Producción Total de Gas (PTG).....	32
Producción de CH ₄	32
Degradabilidad <i>In Vitro</i> de la Materia Seca (DIVMS).....	37
Perfil de Bacterias Metanogénicas obtenido a partir de PCR-DGGE...	39
Perfil de Bacterias Totales obtenido a partir de PCR-DGGE.....	41
CONCLUSIONES.....	44
RECOMENDACIONES.....	45
LITERATURA CITADA.....	46

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Tasa de cambio (%) en la Producción Total de Gas (PTG) bajo diferentes niveles de carvacrol.	33
2	Tasa de cambio (%) en la producción de CH ₄ bajo diferentes niveles de carvacrol.	35
3	Tasa de cambio (%) en la degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS) producción de metano bajo diferentes niveles de carvacrol.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismo del efecto invernadero	5
2	Mecanismo de la metanogénesis ruminal	8
3	Mecanismo de acción del timol y el carvacrol sobre la membrana plasmática	16
4	Dinámica poblacional de las bacterias metanogénicas en los diferentes tratamientos (T:C). 1=100:00, 2=80:20, 3=60:40, 4=40:60, 5=20:80, 6=00:100 y Ct=Control	40
5	Dinámica poblacional de las bacterias totales en los diferentes tratamientos (T:C). 1=100:00, 2=80:20, 3=60:40, 4=40:60, 5=20:80, 6=00:100 y Ct=Control	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Perfil nutricional de los ingredientes utilizados como sustrato en la fermentación <i>in vitro</i>	25
2	Iniciadores utilizados para amplificar el gen ARNr 16S y la región V3 de las bacterias metanogénicas y totales	28
3	Interpretación de un dendograma	31

INTRODUCCIÓN

La metanogénesis es un proceso metabólico en el cual se produce el CH_4 y es realizado por bacterias metanogénicas. Este proceso implica la reducción de metabolitos como CO_2 e H_2 a CH_4 , el cual no puede ser utilizado por el rumiante. De esta manera, las bacterias metanogénicas mantienen baja la presión parcial de H^+ en el rumen (Anderson y Rasmussen, 1998). La metanogénesis ruminal representa pérdidas del 3% en dietas a base de concentrado, mientras que en aquellas a base de forrajes se pierde hasta el 12% de la energía total consumida (Johnson y Johnson, 1995), lo cual representa pérdidas económicas en la producción animal. Además, el CH_4 ha sido reconocido como un gas con efecto invernadero (GEI).

Para mitigar el impacto económico y ambiental de la producción de CH_4 a partir de los rumiantes, se han usado algunos compuestos químicos, dentro de los que destacan: anabólicos, ionóforos, probióticos (levaduras y bacterias) y antibióticos. Sin embargo, debido a que se ha detectado la presencia de residuos de estas últimas sustancias en la carne y la leche y de la aparición de cepas bacterianas resistentes, la Unión Europea prohibió su uso en animales para consumo humano. Como alternativa viable, se investiga el efecto de metabolitos que se encuentran en las plantas, llamados aceites esenciales (AE). El interés por el estudio de los AE se basa en que existe evidencia de que promueven el crecimiento mediante la modificación de la metanogénesis ruminal.

Se ha observado que los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEO), timol (T) y carvacrol (C), son capaces de modificar la fermentación ruminal y disminuir la producción de CH₄ *in vitro* (Patra y Yu, 2012). La adición de AEO *in vitro* en dosis de 1.0 g·L⁻¹ disminuye la metanogénesis hasta en un 87% (Patra y Yu, 2012); sin embargo, se ha observado que la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y fibra detergente neutro (FDN), la concentración de bacterias metanogénicas, protozoarios y bacterias celulolíticas se disminuye linealmente a medida que se incrementa la dosis de 0.25 g·L⁻¹ hasta 1.0 g·L⁻¹ de AEO (Patra y Yu, 2012). Otro estudio reciente reporta que la adición de dosis mayores a 0.2 g·L⁻¹ de T y C disminuyen la producción total de gas (PTG), la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) y la FDN (Kamalak *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso combinado de T y C no se ha investigado; además, aún no se determina una dosis óptima que disminuya la producción de CH₄ sin afectar los parámetros de fermentación ruminal. Es posible que ambos metabolitos ejerzan un efecto sinérgico sobre la metanogénesis.

Por lo tanto, el objetivo fue evaluar distintas proporciones de T y C a una dosis de 0.2 g·L⁻¹ sobre la producción de CH₄, degradabilidad de la materia seca, así como la diversidad de las poblaciones de microorganismos ruminales bajo condiciones *in vitro*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Gases con Efecto Invernadero

El aumento en la temperatura del planeta y el consecuente cambio climático, han sido resultado de la emisión de gases con efecto invernadero (GEI; Vijaya VenkataRaman, 2012). Los GEI de mayor importancia con respecto a su producción y su contribución al cambio climático son el vapor de agua (36-70%), CO₂ (9 – 26%), CH₄ (4 – 9%), y N₂O (3 – 7%).

El CH₄ es considerado el segundo gas responsable del calentamiento global (Xiaoli *et al.*, 2010) debido a que posee un potencial para atrapar los rayos solares 20 veces mayor al CO₂ (EPA, 2010). El CH₄ se produce a través de dos vías, la natural y la antropogénica (Vijaya VenkataRaman, 2012). Las fuentes naturales son: pantanos (Li *et al.*, 2010), termitas, incendios forestales (Mackie y Cooper, 2009), pastizales (Jones *et al.*, 2005), lagos (Makhov, 1999) y yacimientos de carbón (Ozdemir, 2009), y las fuentes antropogénicas son los drenajes (Raco *et al.*, 2010), plantíos de arroz (Zhang *et al.*, 2009), minas de carbón (Su *et al.*, 2011), procesamiento de gas y petróleo (Wang *et al.*, 2011), plantas tratadoras de agua (Shahabadi *et al.*, 2010), manejo de estiércol (Park *et al.*, 2011) y fermentación entérica a partir de los rumiantes (Brown *et al.*, 2011). Se estima que el ganado productor de leche desperdicia hasta un 6.5% de CH₄ (IPCC, 2006), lo que representa aproximadamente 18 g de CH₄·kg⁻¹ de MS consumida por una vaca con una producción de 6,270 kg de leche en promedio por lactancia (Banink *et al.*, 2011).

Efecto Invernadero

Este es un mecanismo mediante el cual el planeta mantiene la temperatura constante (Barry y Chorley, 2003). Sin él, la tierra estaría 33°C por debajo de la temperatura normal (Rivera, 1999). Este efecto inicia con la emisión de luz en forma de radiaciones de onda corta (ultravioleta) desde el sol, las cuales viajan en el espacio hasta llegar a la atmósfera. Una parte de esta radiación es reflejada de regreso hacia el espacio exterior por la superficie brillante de las nubes, mientras que otra parte penetra la atmósfera hasta llegar a la superficie terrestre, ya que las moléculas de aire (N_2 y O_2) no son capaces de retener las radiaciones de onda corta. De la radiación que logra llegar hasta la superficie terrestre, una parte es reflejada hacia el espacio exterior y otra es retenida en la superficie en forma de calor (Rusell, 2007). Además de la radiación de onda corta, la superficie terrestre también refleja la radiación de onda larga (infrarroja), que de igual manera tienen su origen desde el sol. Estas radiaciones son captadas por moléculas de CO_2 , CH_4 , NO_2 , clorofluorocarbonos y vapor de agua que se encuentran en la atmósfera. Estas moléculas reflejan los rayos ultravioleta e infrarrojos hacia la tierra mediante su vibración (Garduño, 1998), conservando de esta manera dentro de la atmósfera los rayos solares de ambos tipos y, consecuentemente, aumentando la temperatura del planeta (Bonilla y Lemus, 2012). En la Figura 1, se muestra el mecanismo de efecto invernadero.



Figura 1. Mecanismo del efecto invernadero.
Fuente: Caballero *et al.*(2007)

Metanogénesis Ruminal

La metanogénesis ruminal es una vía metabólica en la que tiene lugar la síntesis de CH₄ (Blaut, 1994). El CH₄ es sintetizado en el tracto gastrointestinal por un grupo específico de bacterias, las cuales pertenecen al dominio *Archaea* llamadas metanogénicas (Liu y Whiteman, 2008). Sin embargo, existen otros grupos de microorganismos que intervienen en la producción de este compuesto y que se encuentran estrechamente relacionadas con las bacterias metanogénicas, ya sea para facilitarles un ambiente adecuado o proveyendo los sustratos necesarios para la producción de CH₄, por ejemplo las bacterias fibrolíticas, que participan en la transformación de la materia orgánica hasta AGV's, CO₂ y H₂, (Morgavi *et al.*, 2010). Además, se ha observado que microorganismos tales como los hongos y los protozoarios también están íntimamente asociados con las bacterias metanogénicas (Williams *et al.*, 1994). De esta manera, los protozoarios cumplen un papel importante en la metanogénesis, debido a que participan en la transferencia interespecie de H₂, siendo estos productores y donadores de H₂ (Blaut, 1994), el cual es utilizado para la reducción del CO₂ a CH₄ por las bacterias metanogénicas. Esta acción contribuye a mantener baja la concentración de H₂ y a la vez impide que la fermentación ruminal se detenga (Kong *et al.*, 2012).

La metanogénesis constituye el último paso en la fermentación de la materia orgánica, siendo el CO₂ el sustrato más utilizado en la síntesis de CH₄ (Blaut, 1994). El formil-metanofurano (CHO-MF) es el primer compuesto metanogénico estable, su síntesis es llevada a cabo por la enzima formil-

metanofurano deshidrogenasa. En esta reacción están involucrados el CO_2 , el metanofurano (MF) y el H_2 . La síntesis del siguiente compuesto, el metenil-tetrahidrometanopterin ($\text{CHO-H}_4\text{MPT}$) está a cargo de la enzima formil transferasa. La función de esta enzima es retirar el grupo CHO para integrar en su lugar el grupo H_4MPT . En seguida, $\text{CHO-H}_4\text{MPT}$ sufre dos reducciones. La primera de ellas está a cargo de la enzima metileno-tetrahidrometanopterin deshidrogenasa para producir metileno-tetrahidrometanopterin ($\text{CH=H}_4\text{MPT}$), y la segunda de ellas es una reacción de reducción reversible catalizada por la enzima metileno-tetrahidrometanopterin reductasa, la cual produce metil-tetrahidrometanopterin ($\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$). Ambas reacciones de reducción dependen de la coenzima F_{420} como fuente de H^+ . A continuación, el grupo CH_2 del metil- H_4MPT , es transferido a la coenzima M para obtener metil-coenzima M ($\text{CH}_2=\text{CoM}$). Esta reacción está catalizada por la enzima metil transferasa. Por último, toma lugar la reacción en la que se sintetiza al CH_4 . Lo que sucede en esta reacción es la reducción del $\text{CH}_2=\text{CoM}$, en la que la enzima metil-coenzima M reductasa sintetiza al CH_4 (Figura 2).

Factores que Influyen en la Metanogénesis Ruminal

Algunos factores identificados como modificadores de la metanogénesis son el consumo de MS, tasa de pasaje, la proporción entre el forraje y el concentrado y el procesamiento de los ingredientes. Existe una relación estrecha entre la metanogénesis ruminal y el consumo de materia seca, ya que en animales con un alto consumo, la metanogénesis ruminal tiende a aumentar; sin embargo, también influyen otros aspectos como las características físico-

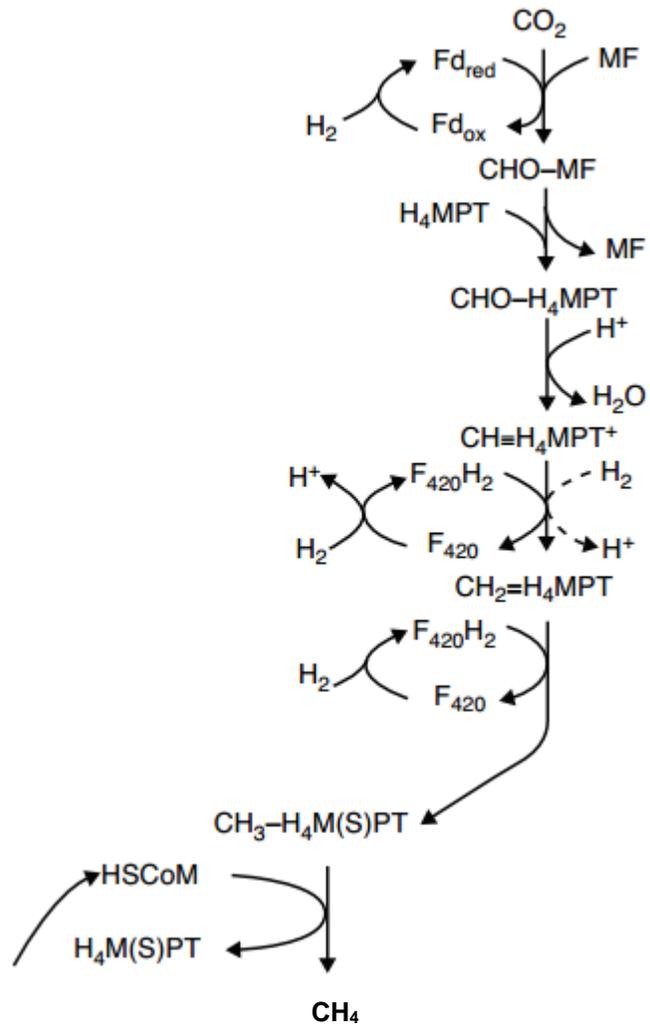


Figura 2. Mecanismo de la metanogénesis ruminal.
Fuente: Ferry, (2012)

químicas del alimento, las cuales impactan sobre el consumo y la frecuencia de alimentación (Montenegro y Abarca, 2000). En este sentido, Moss *et al.* (2000) mencionan que también existe una relación estrecha entre la tasa de pasaje y la metanogénesis. Ésto significa que a medida que aumenta la tasa de pasaje, la metanogénesis ruminal disminuye alrededor de un 30%. Sin embargo, resulta complicado medir la tasa de pasaje debido a que el tamaño de partículas difiere dentro del rumen, por lo tanto pasan a través del rumen a tasas distintas (Van Soest, 1994). Por otro lado, la proporción entre forraje y concentrado influye sobre la metanogénesis ruminal. Por ejemplo, la adición del 90% de concentrado a la dieta trae como consecuencia una disminución de 6.86 a 6.22 en el pH ruminal, pH en el que la metanogénesis disminuye. Este efecto se debe posiblemente a la competencia entre la producción de propionato y la metanogénesis por el H₂ del medio (Russell, 1998). Por último, procesos tales como la molienda o el peletizado de los ingredientes también influyen de manera negativa sobre la metanogénesis. Esto puede deberse a que el menor tamaño de partícula del alimento promueve una mayor tasa de pasaje y, por lo tanto, menor tiempo para la metanogénesis en el rumen (Johnson, 1995).

Estrategias para Mitigar la Producción de CH₄ Entérico

Inoculación ruminal de bacterias acetogénicas. Durante la fermentación de los alimentos en el rumen, se producen iones H⁺ y otros compuestos simples (Morgavi *et al.*, 2010). Ahí existen poblaciones de microorganismos llamados hidrogenótrofos, tales como las bacterias metanogénicas y acetogénicas que utilizan estos iones en su metabolismo. De

no existir estos microorganismos, la reoxidación de coenzimas reductoras como el NADH^+ no sería posible, el lactato se acumularía (Wolin *et al.*, 1997), el crecimiento bacteriano se reduciría (Joblin, 1999) y, finalmente, la fermentación ruminal se detendría (Kong *et al.*, 2012). Por lo tanto, para que la fermentación del alimento se desarrolle de manera normal, los microorganismos hidrogenótrofos se encargan de mantener baja la presión parcial de H_2 en el rumen mediante el consumo de iones H^+ , ya sea para la producción de CH_4 o de acetato (Joblin, 1999), por lo que ambos grupos compiten naturalmente por estos iones. La inoculación ruminal de bacterias acetogénicas ayudaría a reducir la emisión de CH_4 , poniendo fuera del alcance de las bacterias metanogénicas el H_2 libre; sin embargo, estas bacterias no son capaces de proliferar cuando son inoculadas dentro del rumen (López *et al.*, 1999).

Compuestos no Naturales

Nitrocompuestos. Los nitrocompuestos son sustancias químicas de bajo peso molecular que contienen grupos nitrogenados. Se obtienen a partir de la industria como residuos químicos o de manera natural a partir de las plantas de *Astragalus*, *Coronilla* e *Indigofera* (Smith y Anderson, 2013). Se ha comprobado en estudios *in vitro* e *in vivo* que estos compuestos tienen efecto bactericida sobre bacterias patógenas tales como *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *E. coli* O157:H7 y *Shigella sp.*, incluso son capaces de disminuir la producción de CH_4 a partir de las bacterias metanogénicas (Smith y Anderson, 2013). En este sentido, los nitrocompuestos utilizados para estos propósitos son nitroácidos, nitroalcoholes y nitroalcanos. Ejemplos de este

último grupo son el 2-nitroetanol, 2-nitro-1-propanol, 3-nitro-1-propionato y nitroetano (Gutiérrez-Bañuelos *et al.*, 2008).

En un estudio *in vivo* para observar el efecto del nitroetano (0, 30, 60 y 120 mg·kg⁻¹ de PV por día) en becerros Holstein sobre la emisión de CH₄, el consumo de MS y los parámetros de fermentación ruminal, se observó que el consumo de MS disminuyó en forma cuadrática conforme aumentó la dosis, determinándose en las dosis de 60 y 120 mg·kg⁻¹ de PV diario una reducción del 14 y 7%. La emisión de CH₄ disminuyó en forma lineal a medida que la dosis de nitroetano aumentó. Esta disminución representa un 22% de la energía total consumida y hasta un 26% de la emisión diaria (Brown *et al.*, 2011). Además, la concentración total de AGV's no fue afectada por la adición de nitroetano; sin embargo, la proporción acetato:propionato tendió a disminuir linealmente conforme incrementó la dosis (Brown *et al.*, 2011).

Existe poca información acerca de la seguridad y el destino de los nitrocompuestos en el animal y el medio ambiente, por lo que debe continuar su investigación para obtener productos confiables e inocuos. Además, no hay evidencia acerca del uso de nitrocompuestos disponibles en el mercado (Brown y Anderson, 2013).

Compuestos Naturales

Ionóforos. Los ionóforos, como la monensina sódica y la lasalocida, son poliéteres carboxílicos producidos de forma natural a partir de la cepa *Streptomyces cinnamonensis*. Estos compuestos reducen la incidencia de enfermedades metabólicas y las causadas por patógenos en el ganado de

engorda (Callaway, 2003), aumentan la producción de propionato, disminuyendo la población de bacterias Gram-positivas (Russell y Strobel, 1989), disminuyen la producción de NH_4 y reducen la producción de CH_4 entre 4 y 31% (Rumpler *et al.*, 1986). Estos efectos se deben a que en la estructura química del ionóforo se encuentran grupos polares con oxígeno como el COO^- y OH^- (Pressman, 1976). Por tanto, los ionóforos se unen mediante puentes de hidrógeno, interacciones carga-carga y fuerzas de Van der Waals a la membrana de las bacterias, afectando su potencial de acción (Elsasser, 1984). Para contrarrestar este proceso, las bacterias inician un proceso de bombeo para alcanzar el equilibrio ácido-base interno a costa del gasto de ATP (Henderson *et al.*, 1969). Así, la monensina sódica promueve el intercambio de iones H^+ y Na^+ del exterior hacia el interior por iones K^+ , provocando que haya una acumulación de H^+ y Na^+ , y como consecuencia la disminución del pH intracelular. En estas condiciones, la monensina sódica provoca la salida de iones H^+ y la entrada de más iones Na^+ , causando que las reservas de energía disponible se agoten (Russell, 1987).

Un estudio realizado con ganado lechero, demuestra que el consumo prolongado de ionóforos reduce la producción de CH_4 hasta un 7%, con efecto prolongado hasta por 6 meses, sin observarse efectos negativos en la producción de leche (Odongo *et al.*, 2007). Para explicar este efecto, Russell y Strobel (1989) mencionan que la reducción no se debe a la disminución en la cantidad de bacterias metanogénicas, sino al desarrollo de rutas alternas como la formación de propionato y succinato. En este sentido, Vogels *et al.* (1980) y

Tokura *et al.*(1999) realizaron estudios para evaluar el efecto de los ionóforos sobre poblaciones de microorganismos en el rumen. Observaron que el número de protozoarios se redujo, mientras que el número de bacterias metanogénicas no se vio afectado por el tratamiento. Otros estudios demuestran que la adición prolongada de ionóforos en dietas para rumiantes provoca adaptación de las poblaciones de protozoarios y metanógenos ruminales, por lo tanto, su efecto no siempre persiste (Beauchemin *et al.*, 2009).

Sin embargo, existe una tendencia a evitar el uso de los promotores de crecimiento como los ionóforos para utilizar sustancias naturales. Por lo tanto, el uso de ionóforos en la alimentación de rumiantes para disminuir la emisión de CH₄ puede representar una desventaja.

Aceites Esenciales (AE). Los AE son mezclas complejas de metabolitos secundarios de carácter lipofílico de las plantas (MSP). Estos son los responsables del olor y sabor característico de las plantas que los contienen, los cuales son extraídos por destilación (Burt, 2004). Los AE pueden funcionar también como protectores contra agentes estresantes, así como atrayentes de insectos polinizantes y dispersores de semillas (Winky Schimmer, 1999) o bien como metabolitos de reserva cuando los metabolitos de interés primario se encuentran en exceso (Gottlieb, 1990).

Se ha observado que los AE tienen efectos medicinales, virucida, fungicida, insecticida, desparasitante y antimicrobiano (Bakkali *et al.*, 2008). Este efecto resulta de interés debido a su capacidad de afectar a bacterias metanogénicas, protozoarios y hongos, por su asociación estrecha con dichas

bacterias (Williams *et al.*, 1994), lo que indirectamente reduce las emisiones de CH₄ (Macheboeuf *et al.*, 2008).

Existen alrededor de 200,000 sustancias contenidas en las plantas identificadas como principios activos (Patra y Saxena, 2010). Dos de ellos son el timol y el carvacrol, los cuales son los principales AE derivados de las plantas de *Thymus capitatus* y *Origanum vulgare* (Patra y Yu, 2012). Químicamente, el timol es un monoterpeno fenólico. Se ha encontrado que tiene una amplia actividad antimicrobiana y su espectro de acción abarca tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Walsh *et al.*, 2003). Por otra parte, el carvacrol, otro monoterpeno fenólico, también muestra actividad antimicrobiana, la que posiblemente se debe a la presencia de grupos OH⁻ y compuestos fenólicos en su estructura molecular, que pueden participar en la interrupción del transporte de iones a través de la membrana celular y la inactivación de enzimas microbianas (Burt, 2004). Por su parte, Lambert *et al.* (2008) mencionan que ambos aceites desequilibran los gradientes de iones H⁺ y K⁺, provocando de esta manera un gasto de ATP, ya sea inhibiendo su síntesis o promoviendo su hidrólisis. En la Figura 3 se muestra el mecanismo propuesto por Lambert *et al.* (2008) acerca de la acción del timol y el carvacrol sobre la membrana plasmática. Borchers (1965) observó que la adición de caseína y timol en dosis de 1 g·L⁻¹ a cultivos *in vitro* aumenta la concentración de aminoácidos, por lo tanto, la de NH₄ fue menor. Por su parte, Evans y Martin (2000) demostraron que el timol en dosis de 100 a 400 g·L⁻¹ afecta el metabolismo de las bacterias ruminales, disminuye la digestibilidad de los nutrientes e incrementa la

proporción acetato:propionato. En otro estudio (Kamalak *et al.*, 2011), se evaluaron distintas dosis de timol (0, 50, 100, 200 mg·L⁻¹) sobre los parámetros de fermentación *in vitro*. En este estudio se observó que la producción total de gas, la digestibilidad de la MO, la energía metabolizable (MJ·kg⁻¹ de MS) del sustrato utilizado (alfalfa), la concentración total de AGV's, proporción de acetato y butirato y la relación acetato:propionato tendieron a disminuir en forma lineal, excepto el pH y la proporción de propionato, los cuales tendieron a aumentar conforme aumentó la dosis de timol. Por otra parte, García *et al.* (2007) compararon el efecto del carvacrol en relación a la monensina sódica sobre la degradabilidad de la MS, PC, FDN y la concentración de AGV's *in vitro*. Las dosis que utilizaron fueron 250 (C250) y 500 mg·L⁻¹ de carvacrol (C500) y 7.5 mg·L⁻¹ de monensina sódica (M). Estos autores observaron que la degradabilidad de la MS, PC y FDN disminuyeron con la dosis C250, la concentración de butirato incrementó y la de acetato disminuyó, mientras que la concentración de propionato incrementó con la adición de M y la dosis C500 disminuyó la concentración total de AGV's. En un estudio similar, se evaluó el efecto de una mezcla de AE con monensina sódica *in vivo* sobre el consumo de MS, digestibilidad aparente de la FDA y la PC, pH ruminal y la concentración de NH₄. Aquí se observó que el consumo de MS no se afectó con la adición de la mezcla, aunque la digestibilidad aparente de la FDA y PC aumentó un 48.9 y 65.0%, respectivamente, el pH ruminal incrementó a 6.5, mientras que la concentración de NH₄ y el porcentaje de grasa en leche se redujeron a 12.7 mg

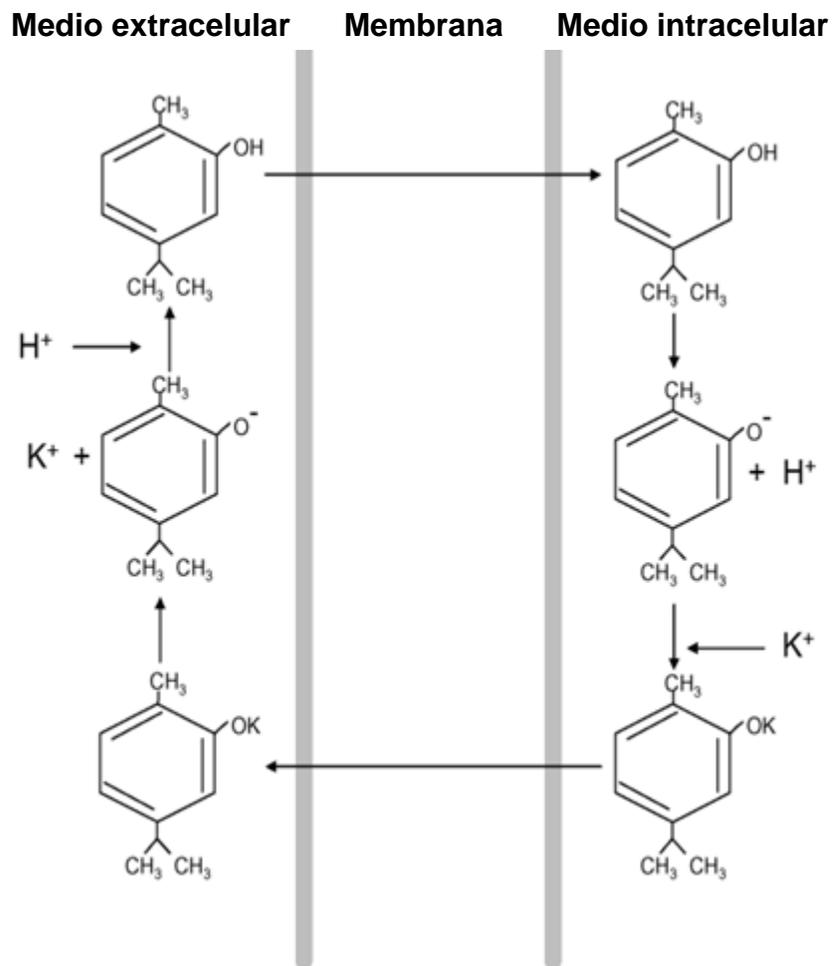


Figura 3. Mecanismo de acción del timol y el carvacrol sobre la membrana plasmática.

Fuente: Lambert *et al.* (2008)

por cada 100 mL y 3.8%, respectivamente, en relación al control (Benchaar *et al.*, 2006). Benchaar *et al.* (2007), evaluaron el efecto de AE sobre los parámetros de fermentación ruminal, flujo duodenal de nitrógeno, producción y composición de la leche, utilizando dietas basadas en ensilado de alfalfa o maíz. Ellos observaron un incremento en el pH ruminal y el porcentaje de lactosa en la leche de las vacas alimentadas a base de ensilado de alfalfa; sin embargo, las vacas alimentadas con ensilado de maíz produjeron leche con un bajo porcentaje de grasa y alta concentración en proteína. La digestibilidad de FDN y FDA fue menor en las vacas alimentadas con ensilado de maíz en relación a las vacas alimentadas con ensilado de alfalfa. El flujo duodenal de nitrógeno de origen bacteriano y la producción del ácido linoleico en leche aumentó en las vacas alimentadas con ensilado de maíz (Benchaar *et al.*, 2007). Patra y Yu (2012) evaluaron el efecto de los AE de clavo, eucalipto, ajo, orégano y canela en las dosis 0.25, 0.50 y 1.0 g·L⁻¹ de cultivo sobre producción de CH₄, parámetros de fermentación, bacterias fibrolíticas, metanogénicas y protozoarios *in vitro*. Ellos reportaron que la producción de CH₄ se redujo (P <0.05) en 34.4, 17.6, 42.3, 87 y 25.7%, respectivamente, para las diferentes fuentes de AE evaluadas, en comparación al control. Además, la digestibilidad de la MS y FDN disminuyeron (P <0.05) en forma lineal conforme aumentó la dosis de AE, a excepción del AE de ajo, mientras que la concentración total de AGV's no se vio afectada con los aceites de ajo, eucalipto y canela. La proporción acetato:propionato y la concentración de butirato aumentaron (P <0.05) con los aceites de clavo, orégano y canela en las dosis 0.5 y 1.0 g·L⁻¹.

Las poblaciones de bacterias fibrolíticas, metanogénicas y de protozoarios mostraron una tendencia lineal a disminuir conforme aumentó la dosis. Por tanto, este estudio demuestra que el aceite de orégano es una alternativa viable para reducir las emisiones de CH₄.

A pesar de que se ha demostrado el efecto bactericida de los AE, estos efectos dependen de la variedad de la planta, el método de extracción, las condiciones de crecimiento o de la composición del aceite (Calsamiglia *et al.*, 2007). Por ejemplo, el contenido de carvacrol en *Origanum vulgare* varía entre 0.43 y 79.6% y el de timol entre 0.44 y 31.8% (Sivropoulou *et al.*, 1996).

Taninos y saponinas. Los taninos y las saponinas también son considerados como MSP. Químicamente, las saponinas son compuestos glucosilados divididos en tres grupos: triterpenoides, esteroides y glucoalcaloides esteroidales (Hosttetmann y Martson, 1995). En condiciones naturales, permanecen inactivos en el interior de la célula y su activación ocurre vía enzimática cuando microorganismos patógenos atacan a la planta (Osbourn, 1999). Por otro lado, los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos de alto peso molecular con capacidad de formar complejos irreversibles con las proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y minerales (Schofield *et al.*, 2001). Los taninos se dividen en dos grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables (Mueller-Harvey, 1999).

Se ha reportado que en condiciones *in vitro* e *in vivo* los taninos condensados, al igual que los AE, tienen efecto antimetanogénico. De acuerdo con Tavendale *et al.* (2005), la producción de CH₄ se inhibe completamente en

cultivos que contienen exclusivamente bacterias metanogénicas. Este efecto sugiere que los taninos pueden inhibir el metabolismo de las bacterias metanogénicas (Williams *et al.*, 2011). Además, también son capaces de inhibir a las bacterias celulolíticas y proteolíticas (McSweeney *et al.*, 2001). Estas observaciones pueden deberse a que las bacterias Gram-positivas son más sensibles al ataque de los taninos en relación a las bacterias Gram-negativas (McSweeney *et al.*, 2001). También se ha observado que los taninos reducen la degradación de las proteínas (Min *et al.*, 2003). Barry *et al.* (2001) mencionan que cantidades de taninos entre 20 – 40 g·kg⁻¹ de MS, forman complejos con las proteínas que las hace no degradables en el rumen, aunque en el abomaso los complejos se disocian debido al pH ácido. Williams *et al.* (2011) utilizaron cultivos continuos y reportan que el flujo y la producción de NH₄ disminuyeron cuando se sustituyó *Medicago sativa* con *Lotus pedunculatus*. Tales resultados sugieren que la incorporación de *Lotus pedunculatus* y otros forrajes que contienen taninos pueden reducir la excreción de NH₄. Por otro lado, las saponinas también muestran efectos sobre los microorganismos ruminales como los protozoarios (Hristov *et al.*, 2003). Este efecto es mediado por su capacidad de formar complejos irreversibles con el colesterol en la membrana del protozoario y finalmente causar su lisis (Francis *et al.*, 2002). También se ha propuesto que los hongos ruminales son sensibles a las saponinas, ya que el número de estos disminuye en respuesta a la suplementación con este tipo de metabolitos secundarios. Otra función de las saponinas, es la de actuar como estimulantes del crecimiento de las bacterias ruminales e inhibidor de otras, tal

como lo reportan Patra y Saxena (2009), quienes observaron que las saponinas estimularon el crecimiento de *Prevotella ruminicola* pero inhibieron el de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*.

Ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos, considerados como modificadores de la fermentación ruminal, son el fumarato y el malato, principalmente. La función del malato en el rumen es servir como receptor de iones H^+ para la síntesis de propionato, de manera análoga a los ionóforos (Scott, 1998). Por tanto, los efectos de la adición de malato son el aumento en el pH, concentración total de AGV's, producción total de gas, mayor proporción de propionato y reducción en la producción de CH_4 hasta en 20.4% (Mohammed, 2004; Liu *et al.*, 2009).

Riede *et al.* (2013) desarrollaron un experimento mediante la técnica RUSITEC (Czerkawski y Breckenridge, 1977) y observaron un aumento en la concentración de propionato; sin embargo, no hubo cambio alguno en la producción de CH_4 , NH_4 , síntesis de proteína microbiana, degradación de nutrientes y las fracciones de fibra. Cuando se adiciona fumarato a la dieta, la producción de propionato se incrementa a la vez que se reduce la producción de CH_4 (López *et al.*, 1999). El fumarato tiene potencial para incrementar la gluconeogénesis y, por tanto, el rendimiento en leche; sin embargo, la cantidad debe restringirse por el riesgo de provocar acidosis ruminal, lo cual disminuye la digestibilidad de la fibra y el consumo de alimento. El mecanismo por el cual el fumarato produce sus efectos benéficos se debe a que desvía los iones H^+ a la producción de propionato (Wood *et al.*, 2009).

Importancia del Estudio del Timol y Carvacrol en Diferentes Proporciones.

Debido a que en la Unión Europea se prohibió el uso de los promotores del crecimiento sintéticos, los AE han surgido como una alternativa viable y natural para su uso en bovinos. Se ha demostrado que funcionan como moduladores de la fermentación ruminal a través de su acción antibacteriana y, además, son capaces de disminuir la metanogénesis ruminal. Por ejemplo, se ha comprobado que el timol y el carvacrol ejercen un efecto antimetanogénico sobre las bacterias metanogénicas del rumen. Sin embargo, este efecto se ha observado por separado. Con base en este hecho, surge la hipótesis de que la combinación del timol y el carvacrol pueden tener un efecto sinérgico sobre la disminución en la producción de CH₄. Por esto, resulta de interés la determinación de una proporción óptima de timol y carvacrol que sea capaz de disminuir la pérdida energética a través de la eliminación del CH₄, a la vez que se incrementa la eficiencia energética en el bovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología para la Alimentación, en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Líquido Ruminal

El líquido ruminal se obtuvo de dos vacas Hereford canuladas ruminalmente, las cuales fueron alimentadas con ensilado de maíz y heno de alfalfa *ad libitum* dos veces al día, a las 8:00 y 15:00 h. De cada vaca, se extrajo una muestra de 250 mL de líquido ruminal 2 h antes de su alimentación por la mañana. Las muestras de líquido ruminal se depositaron en un termo atemperado de 500 mL, se mezclaron y de inmediato se transportaron al laboratorio. Los sitios del rumen que se muestrearon fueron anterior dorsal, anterior ventral, medio, caudal dorsal y caudal ventral.

Medio Ruminal

El medio ruminal se preparó de acuerdo a la técnica de Menke y Steingass (1988). La saliva artificial se preparó con una solución A, la cual se elaboró con 13.2 g de $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 10.0 g de $\text{MnCl}_2\text{4H}_2\text{O}$, 1.0 g de $\text{CoCl}_2\text{6H}_2\text{O}$ y 8.0 g de $\text{FeCl}_3\text{6H}_2\text{O}$ vertidos en 100 mL de agua destilada; una solución B, a la cual se agregaron 9.36 g en 240 mL de agua destilada; una solución C, compuesta con 1.36 g de Na_2HPO_4 , 1.48 g de KH_2PO_4 y 0.14 g de $\text{MgSO}_4\text{7H}_2\text{O}$ en 240 mL de agua destilada; una solución reductora, elaborada con 1.9 mL de NaOH (1M), 0.33 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en 47.5 mL de agua destilada y 712 mL de

agua destilada. Las soluciones reductora, A, B, C, (previamente atemperadas) y la rezasurina, se vertieron dentro de un matraz con agua destilada. El medio fue gaseado con CO₂ hasta que se tornó transparente. Finalmente, se vertieron 500 mL de líquido ruminal a la mezcla sumando un total de 1.5 L de medio ruminal.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar para evaluar el efecto de la adición de T y C sobre los parámetros de fermentación ruminal. Cada tratamiento se evaluó por triplicado. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales se realizó de manera aleatoria a través de un sorteo. Se llevaron a cabo tres corridas en ocasiones diferentes con el objetivo de incrementar el número de repeticiones, realizándose en la medida de lo posible bajo las mismas condiciones.

Tratamientos

Se utilizaron T y C de grado analítico (Sigma-Aldrich) combinándose en seis proporciones diferentes (100:00, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 00:100; T:C) para adicionarlos al medio de cultivo en una dosis de 0.2 g·L⁻¹, además de un control negativo. Se utilizaron jeringas Therumo[®] con capacidad de 60 mL. En cada una se vertieron 30 mL de medio ruminal, el AE en la concentración correspondiente y 0.2 ± 0.001 g de sustrato. Como sustrato se utilizó una ración totalmente mezclada (RTM) para ganado lechero en producción compuesta por un 35% de forraje (ensilado de maíz y alfalfa henificada) y un 65 % de

concentrado. Su perfil nutricional se describe en el Cuadro 1. Finalmente, las jeringas se incubaron a 39 °C con agitación constante a 120 rpm durante 24 h.

Variables de Fermentación Evaluadas

Producción total de gas (PTG). La PTG se determinó a las 24 h de fermentación registrando el volumen libre dentro de la jeringa. De este volumen, se extrajeron 20 mL de gas de cada jeringa y se depositaron en tubos de ensayo provistos de vacío para su análisis por cromatografía de gases.

Composición del gas. La composición del gas se determinó por cromatografía de gases, de acuerdo con la técnica descrita por Zhou *et al.* (2011) para lo cual se usó un cromatógrafo GOW-MAC Serie 580 provisto de una columna empacada Carbosphere 8652PC 80-100, utilizando nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 20 mL·min⁻¹.

Degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Para la determinación de la DIVMS, el contenido de cada jeringa se vació en bolsas ANKOM[®] F57 previamente identificadas para separar la fracción sólida de la fracción líquida. Esta fracción se colectó en tubos Corning[®] para el análisis de la diversidad bacteriana mediante DGGE. En seguida, las bolsas con la fracción sólida se pesaron y se sometieron a desecación en una estufa de aire forzado a 100°C durante 24 h. Finalmente, se realizaron los cálculos con base en la técnica de Tilley y Terry (1963).

Cuadro1. Perfil nutricional de los ingredientes utilizados como sustrato en la fermentación *in vitro*.

Composición	Concentrado	Alfalfa henificada	Ensilado de maíz
MS, %	96.7	92.2	87.9
PC, %	18.3	14.4	29.3
FC, %	6.0	25.6	27.0
NDF, %	14.8	37.9	51.4
ADF, %	5.7	29.2	30.0
Ceniza, %	5.0	5.0	5.0
EE, %	5.6	2.0	3.1

Evaluación de la Diversidad de la Microbiota

Extracción de ADN genómico. Se extrajo ADN genómico de las muestras del contenido microbiológico de las jeringas en cada tratamiento en la última (tercera) corrida del experimento, con el objetivo de observar cómo se modificaron las poblaciones de microorganismos ruminales bajo la influencia de T y C en el medio de cultivo en comparación con el tratamiento control. Las muestras de las tres jeringas de cada tratamiento al final del proceso de fermentación se mezclaron para obtener una muestra representativa. Se utilizó el kit comercial NucleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron 1.2 mL de cultivo ruminal de cada tratamiento y se depositaron en tubos Eppendorf®. Los tubos se centrifugaron a 8,000 xg por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet resultante fue suspendido en 180 µL de buffer T1y 25 µL de la proteinasa K para provocar una lisis celular. Cada tubo se agitó y se incubó a 56°C durante 3h. A continuación, los tubos se agitaron suavemente, se agregaron 200 µL de buffer B3a cada tubo y se incubaron a 70°C durante 10 min. Después, se agregaron 10 µL de etanol. Se utilizaron columnas NucleoSpin® Tissue por la cual se hizo pasar la solución a 11,000 x g durante 1 min para coleccionar el ADN. El líquido coleccionado se descartó. Después, se añadieron 500 µL de buffer BW, se volvió a centrifugar a 11,000 x g por 1 min y el líquido coleccionado se volvió a descartar. Se agregaron 600 µL de buffer B5y se centrifugó a 11,000 x g por 1 min, el líquido se descartó y se volvió a centrifugar a 11,000 x g durante 1 min.

Finalmente, las columnas se cambiaron a tubos Eppendorf® estériles para la elución del ADN con 100 µL de buffer BE.

Cuantificación de ADN. Para determinar la presencia de ADN, se utilizó la técnica de gel de agarosa al 1% en medio de tris borato de ácido etilendiaminotetracético (TBE; Bhilochaet *al.*, 2011) usando como tinción bromuro de etidio (Kasapet *al.*, 2006). La concentración de ADN total se evaluó mediante el equipo NanoDrop 2000® Thermo-Scientific en los rangos de absorbancia 230/260 y 260/260. Una vez cuantificadas, las muestras de ADN se almacenaron a -20°C para su análisis posterior.

Amplificación de ADN por PCR. EL ADN genómico se amplificó mediante la técnica convencional de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se utilizó un equipo Techne® Prime para la amplificación del ADN. Se amplificó un fragmento del gen 16S del ARNr y la región V3 de las bacterias metanogénicas y de las bacterias totales. Se utilizó un volumen de 25 µL por reacción, conteniendo cada una los siguientes ingredientes y cantidades: 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 2 µL de cada primer (forward y reverse), 50 ng de ADN genómico y 6.5 µL de agua libre de nucleasas. Los cebadores que se utilizaron en la amplificación y su secuencia se muestran en el Cuadro 2. Para la amplificación del gen 16S de bacterias metanogénicas y totales se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, 30 ciclos de alineación a 56.5 °C por 30 s

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para amplificar el gen ARNr 16S y la región V3 de las bacterias metanogénicas y totales.

Iniciador	Secuencia (5' a 3')	Posición de alineamiento
Met 86f	GCTCAGTAACACGTGG	86-101
Met 915r	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	915-935
GC-ARC344f	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	344-363
519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	519-534

Fuente: Zhou *et al.* (2010)

para las bacterias metanogénicas y 51 °C por 30 s para las bacterias totales, 30 ciclos de elongación a 68°C por 1 min y un ciclo de elongación final a 68°C por 7 min. El producto de esta amplificación se utilizó como plantilla para la amplificación de la región V3 del gen 16S del ARNr, para lo cual se utilizaron iniciadores de 40 pb provistos de una cola compuesta únicamente de G y C. Las condiciones de amplificación para la generación del amplicón de bacterias metanogénicas y totales son las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, 30 ciclos de alineación a 56.5°C por 30 s para las bacterias metanogénicas y 73.5°C por 30 s para las bacterias totales, 30 ciclos de elongación a 72°C por 30 s y un ciclo de elongación final a 72°C por 7 min. La calidad, concentración y pureza de cada amplificación se determinó mediante espectrofotometría en los rangos de absorbancia 230/260 y 260/280, el tamaño del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa y las imágenes de los geles se generaron en un transiluminador de rayos UV ENDURO (ENDURO™ GDS Gel Documentation System) de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior.

Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). La diversidad microbiana se determinó por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés), para lo cual se utilizó un equipo DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, CA). El gel se elaboró al 8% de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante de 35-60% de urea-formamida, el cual se incrementó en dirección a la electroforesis. Se utilizó

un marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder® (Invitrogen™). En cada pozo se vertieron 2 µL de buffer de carga al 2X y 5 µL de producto de PCR (850 ng·µL⁻¹). El buffer TAE de corrida se preparó al 1X. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 65 V y 60°C durante 16 h. El gel se tiñó con SYBR®Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) a una concentración de 1 µL·mL⁻¹ de buffer TAE al 1X durante 15 min.

Análisis Estadístico

Los resultados de los análisis por triplicado para las variables de fermentación evaluadas se promediaron en cada corrida. Previo a los análisis estadísticos, los valores de las observaciones de las variables evaluadas, en cada tratamiento y corrida, se desviaron con respecto al tratamiento control y se expresaron como porcentaje de cambio en la variable correspondiente al agregar el T y C. Para su análisis se ajustó un modelo lineal con el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS® 2002 Institute Inc. Cary, NC. En un inicio se incluyeron los efectos clasificatorio de corrida y la proporción de T:C como variable de regresión, así como su interacción. Como no se encontró ningún efecto de interacción ($P > 0.05$), al final solo se corrió la regresión lineal simple de las variables respectivas con respecto a la proporción de T:C con PROC REG de SAS, ignorando el efecto de corrida.

Análisis de la Diversidad Microbiana por DGGE

La imagen del gel se analizó con el programa BioNumerics (AppliedMaths, Inc., TX). Se consideró a la adición de T y C en dosis de 0.2 g·L⁻¹

¹ como la única fuente de variación que modifica a las poblaciones de bacterias metanogénicas y de bacterias totales. Se utilizó el coeficiente de similitud de Dice (D_{sc}) para la comparación de patrones de bandeo y el análisis de corchetes para la agrupación de las poblaciones de bacterias de acuerdo al Cuadro 3.

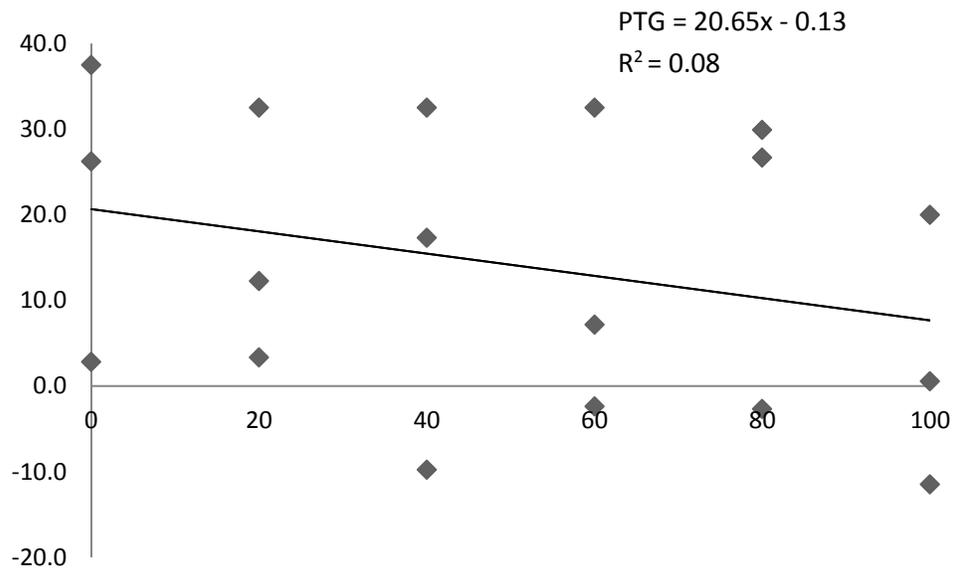
Cuadro 3. Interpretación de un dendograma

Porcentaje	Coefficiente de similitud
≥ 95	Idéntico
90 a 94	Muy similar
85 a 89	Similar
80 a 84	Algo similar
≤ 79	No similar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción Total de Gas (PTG)

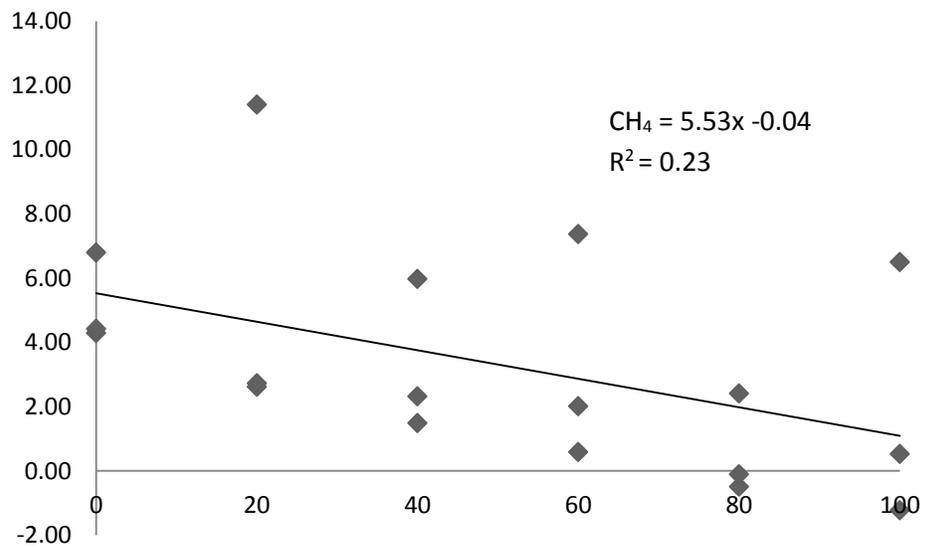
En todos los tratamientos, se observó que el porcentaje de cambio fue positivo, lo que indica que el AE reduce la PTG independientemente de la proporción T:C, estimándose esta reducción en 12 %. Sin embargo, cuando se corrió la regresión lineal para evaluar el efecto de la proporción T:C, ésta no influyó ($P > 0.05$) en el cambio del porcentaje de reducción con respecto al tratamiento control (Gráfica 1). Este resultado es similar al reportado por Patra y Yu (2012), quienes al usar una dosis de $0.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ observaron una reducción de 12 %. Es posible que en nuestro estudio no se observó una tendencia en la reducción con respecto al tratamiento control a medida que se modificó la proporción T:C debido a que el efecto de los AE es dosis-dependiente. Así, en un estudio realizado por Lin *et al.* (2011), quienes usaron una dosis de $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, observaron una reducción de 30 % en relación al control, mientras que en otro estudio se observó una reducción hasta de 81 % cuando se usó una dosis de $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Patra y Yu, 2012). Sin embargo, es deseable que la PTG no disminuya con el uso de modificadores de la fermentación ruminal, ya que la PTG está correlacionada con la digestibilidad de la MS y su disminución significaría comprometer el desempeño productivo del animal (Dijkstra *et al.*, 2005).



Grafica 1. Tasa de cambio (%) en la Producción Total de Gas (PTG) bajo diferentes niveles de carvacrol.

Producción de CH₄

El porcentaje de cambio fue positivo en todos los tratamientos, lo que refleja un efecto del T y C sobre la producción de CH₄. Cuando se corrió la regresión, se observó una tendencia lineal ($P < 0.05$) a reducir el porcentaje de cambio conforme se incrementó la proporción de C (Gráfica 2). Este comportamiento indica que la mayor tasa de cambio se logra con la mayor proporción de timol y este efecto se va perdiendo a una tasa de 0.04 unidades porcentuales por cada unidad porcentual de C que sustituye al T en la composición química del AE. Estos resultados sugieren que el efecto del AE es dosis-dependiente, es decir a mayor dosis del mismo en el medio de cultivo, mayor será su efecto (Macheboeuf *et al.*, 2007). Así, el mayor efecto se observó con el nivel más alto de T, siendo esta reducción de alrededor de 12 % en relación al control. Este valor es similar al reportado por Patra y Yu (2012), quienes observaron que la producción de CH₄ se redujo en un 13 % con respecto al control cuando usaron AEO con una dosis de 0.25 g·L⁻¹, el cual está compuesto principalmente por carvacrol, alcohol β-fenchil, timol y γ-terpineno (Teixeira *et al.*, 2013). En otros estudios se ha observado que en condiciones *in vitro* el AEO es capaz de reducir la metanogénesis hasta en un 99 % cuando se administra a una concentración de 0.9 g·L⁻¹ (Macheboeuf *et al.*, 2008). Por su parte, Patra y Yu (2012) observaron una reducción de 87 % cuando utilizaron AEO en una dosis de 1.0 g·L⁻¹. De la misma manera, el uso de una mezcla de carvacrol, timol y p-cimeno, extraída de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgare*, disminuye la fermentación y la metanogénesis ruminal hasta en 60 % en

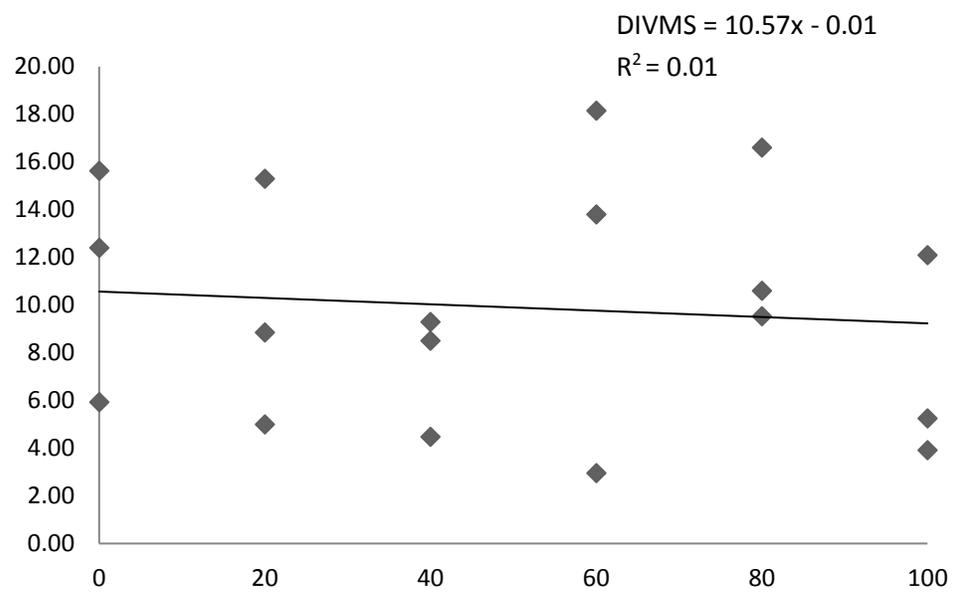


Grafica 2. Tasa de cambio (%) en la producción de CH₄ bajo diferentes niveles de carvacrol.

concentraciones mayores a $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Macheboeuf *et al.*, 2008). Entonces, debido a que el AEO es capaz de reducir la metanogénesis, este efecto implicaría incrementar la eficiencia energética del animal al disminuir la producción de CH_4 a nivel ruminal y, por consecuencia, menor contaminación ambiental. Sin embargo, la presencia de AEO en el medio ruminal en dosis altas ($> a 1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) podría disminuir la fermentación, por lo que su uso debe ser moderado. Este efecto antimetanogénico se debe a la naturaleza lipofílica del AEO, el cual le da la capacidad de adherirse a la bicapa lipídica de las bacterias e inhibir su metabolismo (Patra y Yu, 2012).

Degradabilidad *In Vitro* de la Materia Seca (DIVMS)

El porcentaje de cambio no fue diferente ($P > 0.05$) entre tratamientos (Gráfica 3). Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillejos *et al.* (2007), quienes observaron que el uso de una mezcla de AE *in vitro* no afecta la digestibilidad de la MO (DMO) en dosis bajas. De la misma manera, un estudio *in vivo* con borregos se realizó para evaluar el efecto del T y C sobre la digestibilidad de los nutrientes. Los resultados mostraron que estos AE en dosis de 0.3 y $0.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ no son capaces de afectar la DMO (Westerhold, 2013; Zamiri *et al.*, 2015). Otro estudio realizado *in vivo* con borregos demostró que la adición de AE no modificó la digestibilidad de la MS en comparación al control (Lin *et al.*, 2013). Sin embargo, los AE pueden disminuir la digestibilidad de la MS. Este efecto depende de la dosis que se use, y de la composición química. Un estudio realizado por Patra y Yu (2012) explica estos sucesos. Cuando se utilizaron los AE de eucalipto y ajo no afectaron la digestibilidad de la MS,



Gráfica 3. Tasa de cambio (%) en la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) producción de metano bajo diferentes niveles de carvacrol.

aún con una dosis de $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que con el de orégano dicho parámetro disminuyó drásticamente con la misma dosis. La degradabilidad de la MS es una variable fisiológica determinante en la producción animal. Dentro del rumen, los nutrientes deben quedar disponibles para su aprovechamiento por los microorganismos ruminales y el animal. Por lo tanto, afectar negativamente esta variable tendría como consecuencia disminuir la productividad del animal o incluso comprometer la salud del mismo.

Perfil de Bacterias Metanogénicas obtenido a partir de PCR-DGGE

Las poblaciones de bacterias metanogénicas muestran una dinámica homogénea, esto indica que la adición de AE tiene poco efecto sobre las bacterias en mención. Este efecto es similar a los hallazgos de Patra y Yu (2012) quienes observaron mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) que la adición de AEO es capaz de modificar ligeramente las comunidades de bacterias metanogénicas en el que se observaron únicamente comunidades dominantes aisladas. Con base en lo anterior, es posible que la disminución en la producción de CH_4 no se deba a que los AE afecten directamente a las bacterias metanogénicas, sino que actúan mediante un mecanismo de acción que involucre a los sustratos que intervienen en la metanogénesis o que afecten a las bacterias responsables de la producción de dichos sustratos.

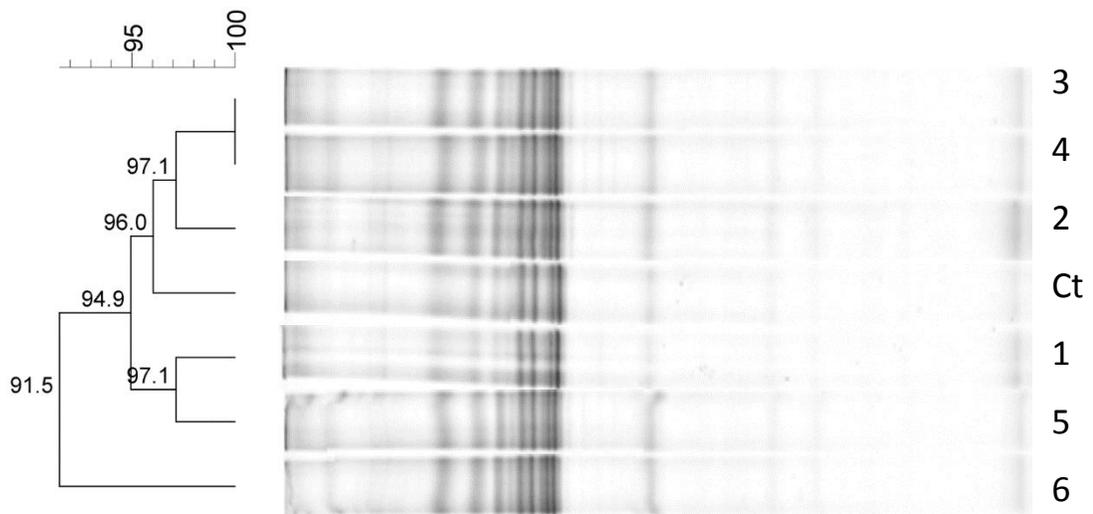


Figura 4. Dinámica poblacional de las bacterias metanogénicas en los diferentes tratamientos (T:C). 1=100:00, 2=80:20, 3=60:40, 4=40:60, 5=20:80, 6=00:100 y Ct=Control.

En la Figura 4 se muestra la dinámica poblacional de las bacterias metanogénicas obtenida a partir de PCR-DGGE, donde se observan patrones de bandeo similares ($D_{sc} > 95\%$) entre los tratamientos, formando dos grupos, el primero incluye las proporciones 60:40, 40:60, 80:20, Ct, 100:00 y 20:80 y el segundo incluye únicamente a la proporción 00:100 con un $D_{sc} = 91.5\%$ entre ambos grupos. La formación del primer grupo puede deberse a que las bacterias metanogénicas metabolizan el T y el C de manera similar o son resistentes a la acción del T (McIntosh *et al.*, 2003), mientras que en el segundo grupo ciertas especies de bacterias metanogénicas son sensibles a la acción del C. Estas observaciones son consistentes con los resultados reportados por Mbirri *et al.*, (2016) quienes mencionan que las poblaciones de bacterias metanogénicas no son modificadas con la adición de C en una dosis de $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta observación puede deberse a que el T y el C fueron agregados a los cultivos ruminales en una dosis baja ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), resultando esta incapaz de realizar cambios en las poblaciones de bacterias metanogénicas.

Perfil de Bacterias Totales obtenido a partir de PCR-DGGE

La adición de AE produce cambios heterogéneos en las poblaciones de bacterias totales. De acuerdo con los hallazgos publicados por Patra y Yu (2012), el efecto del AEO ejerce un mayor impacto sobre las bacterias totales, el cual es consistente con el efecto que se observó en este estudio. La adición de MSP en los cultivos de bacterias causa modificaciones en las poblaciones individuales de microorganismos, por lo tanto algunas poblaciones bacterianas incrementan su tamaño o bien desaparecen. Además, los MSP alteran la

digestión, la fermentación de la dieta y la metanogénesis (Calsamiglia *et al.*, 2007). Estos efectos pueden deberse al tipo de membrana que poseen las bacterias. Las Gram-positivas tales como *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus* (celulolíticas) muestran una mayor susceptibilidad ante los AE en relación a las Gram-negativas, debido a la ausencia de una capa protectora de lipopolisacáridos que protege la pared celular (Burt, 2004).

En la Figura 5 se muestra la dinámica poblacional obtenida a partir de PCR-DGGE. En la imagen se observa la formación de dos grupos. El primer grupo incluye a las proporciones 100:00 y el Ct, y el segundo incluye a las proporciones 60:40, 80:20 y 00:100. En el primer grupo se observa que la proporción 100:00 modifica las poblaciones de bacterias totales con un $D_{SC}=80.0\%$ respecto al Ct. Ésto significa que ambas poblaciones comparten solamente algunas especies de bacterias. Con respecto al segundo grupo, las poblaciones bacterianas con las proporciones 60:40 y 20:80 son idénticas ($D_{SC}=100\%$) y son muy similares con las proporciones 80:20 y 40:60. La proporción 00:100 mantiene un $D_{SC}=85.8\%$ con las demás proporciones del grupo, esto significa que la adición de C provoca cambios mayores sobre las poblaciones de bacterias ruminales en relación al T. Por último, ambos grupos mantienen un $D_{SC}=74.8\%$, lo que significa que las poblaciones de bacterias son totalmente distintas.

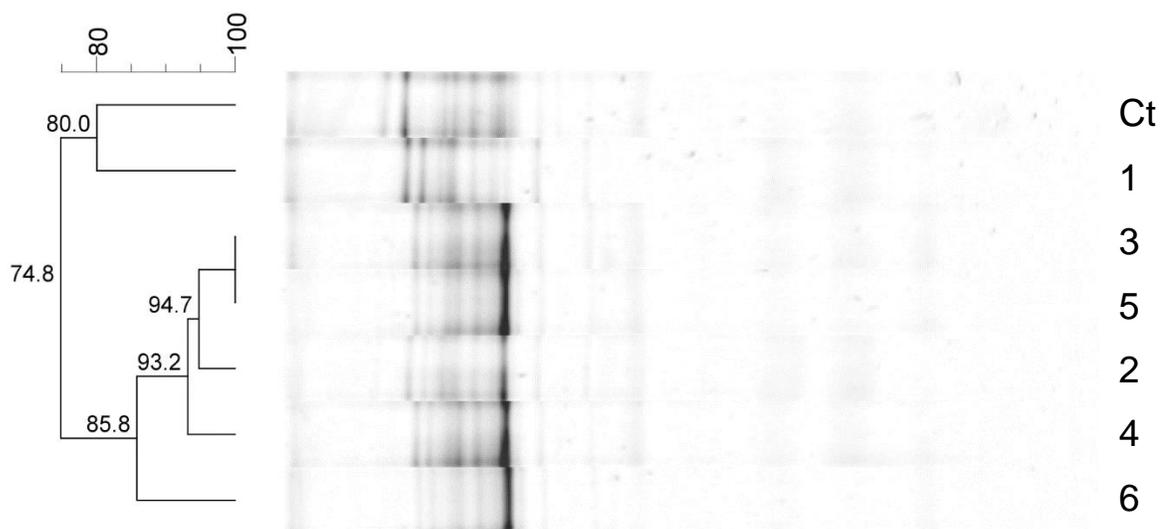


Figura 5. Dinámica poblacional de las bacterias totales en los diferentes tratamientos (T:C). 1=100:00, 2=80:20, 3=60:40, 4=40:60, 5=20:80, 6=00:100 y Ct=Control.

CONCLUSIONES

La adición de AE al medio de cultivo en dosis de $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y con una composición de 100% timol disminuye la producción de CH_4 hasta en un 12% y modifica las poblaciones de bacterias totales. Sin embargo, no afecta la PTG, la DIVMS y las poblaciones de bacterias metanogénicas.

Con base en estas observaciones, es necesario continuar la investigación del T, principalmente enfocada en determinar las vías por las cuales se reduce la metanogénesis toda vez que en este estudio no se observó efecto sobre las bacterias metanogénicas. Así mismo, sobre parámetros de fermentación para asegurar que no hay un efecto negativo sobre producción de ácidos grasos volátiles principalmente y poder estar en condiciones de recomendar esta tecnología como válida para la producción animal.

RECOMENDACIONES

Estudios posteriores deben tomar en cuenta la investigación de variables como AGV's, pH, concentración de amoníaco y de iones H^+ y la secuenciación de ADN de bacterias, la cual permitirá conocer con mayor exactitud qué sucede con la adición de AE en el medio de cultivo.

Además, resulta de interés explorar dosis de T mayores a $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y menores a $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ya que se ha demostrado que este es el rango en el que mejor eficacia podría tener el bajo condiciones fisiológicas.

Por último, sería de suma importancia desarrollar estudios para conocer cuál es el mecanismo mediante el cual los AE disminuyen la producción de CH_4 , ya que hasta la fecha su acción sobre esta variable no está clara.

LITERATURA CITADA

- Aluwong, T., P.A. Wuyep y L. Allam. 2011. Livestock-environments interactions: Methane emissions from ruminants. *Afr. J. Biotechnol.* 10:1265-1269.
- Bannink, A., M. W. Van Schijndely J. Dijkstra. 2011. A model of enteric fermentation in dairy cows to estimate methane emission for the Dutch National Inventory Report using the IPCC Tier 3 approach. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:603–618.
- Barry, T.N., D.M. McNeill y W.C. McNabb. 2001. Plant secondary compounds; their impact on forage nutritive value and upon animal production. In: *Proc. Inter. Grassl.Conf., Sao Paulo, Brazil.*118:445–452.
- Benchaar, C., H.V. Petit, R. Berthiaume, T.D. Whyte, y P.Y. Chouinard. 2006. Effects of addition of essential oils and monensina premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 4352-4364.
- Benchaar, C., A.V. Chaves, G.R. Frase, Y. Wong, K.A. Beauchemin y T.A. McAllister. 2007. Effect of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Can. J. Anim. Sci.* 110:413-419.
- Benchaar, C., H.V. Petit, R. Berthiaume, D.R. Ouellet, J. Chiquette, y P.Y. Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, ruminal microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.* 90:886-897.
- Benchaar, C., S. Calsamiglia, A.V. Cháves, G.R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister y K.A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology.*145: 209–228.
- Benchaar, C. y H. Greathead. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 338–355.
- Bergen, W.G. y D.B. Bates. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58: 1465–1583.
- Bodas, R., N. Prieto, R. García-González, S. Andrés, F. Giráldez, y S. López. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.*176: 78–93.

- Bonilla, C.J., y F.C. Lemus. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al cambio climático. Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 3: 215-246.
- Brown, E.G., R.C. Anderson, G.E. Carstens, H. Gutiérrez-Bañuelos, J.L. McReynolds y L.J. Slay. 2011. Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. Anim. Feed Sci. Technol.;166:275–281.
- Buddle, B.M., M. Denis, G. Attwood, E. Alterman, P. Janssen, R. Ronimus, P. Pinares, S. Muetzel y W. Neil. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. The Veterinary Journal.188: 11–17.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. Int. J. Food Microb.94: 223–253.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M.D. Carro y C. Kamel. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 88: 4393–4404.
- Cardozo, P.W., S. Calsamiglia, A. Ferret y C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at two pH level on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. J. Anim. Sci. 83: 2572–2579.
- Carmona, J.C., D.M. Bolívar y L.A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. Rev. Col. Cienc. Pec. 18: 49-63.
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret y R. Losa. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. Anim. Feed Sci. Technol.119:29–41.
- Chao, S.C., Young, D.G., Oberg, C.J., 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essent. Oil Res. 12, 639–649.
- Chaves, A.V., K. Stanford, L.L. Gibson, T.A. McAllister y C. Benchaar. 2008. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. Anim. Feed Sci. Technol.145:396–408.
- Chaves, A.V., M.L. He, W.Z. Yang, A.N. Hristov, T.A. McAllister y C. Benchaar. 2008. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative, and

- methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Can. J. Anim. Sci.* 88:117–122.
- Corzo-Martínez, M., N. Corzo y M. Villamiel. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Technol.* 18:609–625.
- Cosentino, S., C.I.G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi y F. Palmas. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:130–135.
- Czerkawski, J. W. y G. Breckenridge. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371–384.
- Demeyer, D.I. y K. De Graeve. 1991. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 22:50–61.
- Dijkstra, J., E. Kebreab, A. Bannink, J. France y S. Lopez. 2005. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 123:561-578.
- Dorman, H.J.D. y S.G., Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308–316.
- Duffield, T.F., A.R. Rabiee y I.J. Lean. 2008. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. *J. Dairy. Sci.* 91:1334-1346.
- Elsasser, T.H. 1984. Potential interactions of ionophore drugs with divalent cations and their function in the animal body. *J. Anim. Sci.* 59:845-853.
- EPA. 2010. Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC., USA.
- Evans, J.D. y S.A. Martin. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr Microbiol* 41:336-340.
- Fahey, G.C. y L.L. Berger. 1988. *The ruminant animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 17: 269–297.
- FAO. 2000. http://www.fao.org/3/a-x6366s/x6366s10.htm#P0_0. Consultado Nov. 15, 2012.
- Francis, G., Z. Kerem, H.P.S. Makkar y K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88:587–605.
- Goel, G., H.P.S. Makkar y K. Becker. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to

- saponin rich fractions from different plant materials. *J. Appl. Microbiol.* 105:770–777.
- Gottlieb, O.R. 1990. Phytochemicals differentiation and function. *Phytochemistry.* 29:1715–1724.
- Guan, H., K.M. Wittenberg, K.H. Ominski y D.O. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *J. Anim. Sci.* 84:1896-1906.
- Gustafson, R.H. y R.E. Bowen. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 83:531–541.
- Gworgwor, Z.A., T.F. Mbahi y B. Yakubu. 2006. Environmental implications of methane production by ruminants: A review. *Journal of Sustainable Development in Agriculture and Environment.* 2: 1-14.
- Haney, M.E. y M.M. Hoehn. 1967. Monensin, a new biologically active compound. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:349-352.
- Helander, I.M., H.L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, L. Pol, E.J. Smid, L.G.M. Gorris, A. von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3590–3595.
- Henderson, P.J., J.D. McGivan y J.B. Chappell. 1969. The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. *Biochem. J.* 11: 521-530.
- Hook, S.E., K.S. Northwood, A.G. Wright y B.W. McBride. 2009. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 374–380.
- Hostettmann, K.A. y A. Marston. 1996. Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Hristov, A., M. Ivan, L. Neill y T. McAllister. 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 105:163–184
- IPCC. 2001. Trace gases: Current observations, trend, and budgets. http://www.grida.no/publications/other/ipcc_tar/?src=/climate/ipcc_tar/wg1/134.htm. Consultado Nov. 15, 2012.

- Johnson, K.A. y D.E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
- Jones, S.K., R.M. Rees, U.M. Skiba y B.C. Ball. 2005. Greenhouse gas emissions from a managed grassland. *Global and Planetary Change.* 47:201–211.
- Kamalak, A., O. Canbolat, Ç.Ö. Özkan y A.I. Atalay. 2011. Effect of thymol on *in vitro* gas production, digestibility and metabolizable energy content of alfalfa hay. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17:211-216.
- Killeen, G.F., C.A. Madigan, C.R. Connolly, G.A. Walsh, C. Clark, M.J. Hynes, B.F. Timmins, P. James, D.R. Headon y F. Ronan. 1998. Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their *in vitro* properties for their *in vivo* impact. *J. Agric. Food Chem.* 46:3178–3186.
- Kobayashi, Y. 2010. Abatement of methane production from ruminants: Trends in the manipulation of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23:410 – 416.
- Kobayashi, Y., M. Wakita y S. Hoshino. 1988. Persistency of salinomycin effect on ruminal fermentation in wethers. *Nutr. Rep. Int.* 38:987-999.
- Lajoie, S.F., S. Bank, T.L. Miller y M.J. Wolin. 1988. Acetate production from hydrogen and ¹³C carbon dioxide by the microflora of human faeces. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2723–2727.
- Lambert, R.J.W., P.N. Skandamis, P. Coote, y G.-J.E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453–462.
- Li, T., Y. Huang, W. Zhang y C. Song. 2010. A biogeophysical model for simulating methane emissions from natural wetlands. *Ecological Modelling.* 221:666–680.
- Lin, B., J. H. Wang, Y. Lu, Q. Liang y J. X. Liu. 2011. *In vitro* rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97: 1-9.
- Lin, B., Y. Lu, A.Z.M. Salem, J. H. Wang, Q. Liang y J. X. Liu. 2013. Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. *Anim. Feed Sci. Technol.* 184:24-32.

- Liu, Q., C. Wang, W.Z. Yang, Q. Dong, K.H. Dong y Y.X. Huang. 2009. Effects of malic acid on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Animal*. 3:32-39.
- López, S., F.M. McIntosh, R.J. Wallace y C.J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 78: 1-9.
- López, S., R. García-González, M. Fernández, R. Bodas, J.S. González. 2007. Medicinal plants as feed additives in animal nutrition. In: Singh, K.k., Govil, J.N., Ahmad, K., Sharma, R.Kr. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants*, vol. 15: Natural Products. Studium Press LLC, Houston, TX, USA, pp. 309–333.
- Macheboeuf, D., D.P. Morgavi, Y. Papon, J.L. Mousset y M. Arturo-Schaan. 2008. Dose–response effects of essential oils on *In vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 335–350.
- Mackie, K.R. y Cooper, C.D. 2009. Landfill gas emission prediction using Voronoi diagrams and importance sampling. *Environmental Modelling and Software*.24:1223–32.
- Makhov, G.A., N.M. Bazhin.1999. Methane emission from lakes. *Chemosphere*. 38:1453–9
- Makkar, H.P.S., M. Blümmel y K. Becker. 1995. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 69:481–493.
- Malecky, M., L.P., Broudiscou, P. Schmidely. 2009. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154:24–35.
- Mathieu, F., J. Jouany, J. Senaud, J. Bohatier, G. Bertin y M. Mercier. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod.Nutr.Dev.*36:271–287.
- McAllister, T.A., T. Martínez, H.D. Bae, A.D. Muir, L.J. Yanke y G.A. Jones. 2005. Characterization of condensed tannins purified from legume forages: chromophore production, protein precipitation and inhibitory effects on cellulose digestion. *J. Chem. Ecol.* 31:2049–2068.

- McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R.J. Wallace, D.A. Beever y C.J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5011–5014.
- McSweeney, C., B. Palmer, R. Bunch y D. Krause. 2001. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90:78–88.
- Menke, K.H. y Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28:7-55.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz y W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93:217-222.
- Mohammed, N., N. Ajisaka, Z.A. Lila, K. Mikuni, K. Hara, S. Kanda, H. Itabashi. 2004. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *J. Anim. Sci.* 82:1839–1846.
- Moss, A.R., J.P. Jounany y J. Neewbold. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zotech.* 49:231-253.
- Newbold, C.J., F.M. McIntosh, P. Williams, R. Losa, y R.J. Wallace. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:105–112.
- Newbold, C.J., S.M. E.I. Hassan, J. Wang, M.E. Ortega y R.J. Wallace. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78:237–249.
- Odongo, N.E., R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, M. M. Or-Rashid, S.E. Hook, J.T. Gray, E. Kebreab, J. France y B.W. McBride. 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1781-1788.
- Ohene-Adjei, S., A.V. Chaves, T.A. McAllister, C. Benchaar, R.M. Teather y R.J. Forster. 2008. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microb. Ecol.* 56:234–242.
- Okuda, T., K. Mori y T. Hatano. 1985. Relationship of the structures of tannins to the binding activities with hemoglobin and methylene blue. *Chem. Pharm. Bull.* 33:1424–1433.
- Ordoñez, D.J. y T.T. Hernández. 2008. Inventario Nacional De Gases De Efecto Invernadero 2009: Parte 4. Sector Agricultura. INEGI.

- Osbourn, A.E., B.R. Clarke, P. Lunness, P.R. Scott y M.J. Daniels. 1994. An oat species lacking avenacin is susceptible to 16 FigenMertinfection by *Gaeumannomycesgraminis* var. *tritici* .Physiol. Mol P. Pathol. 45:457-467.
- Ozdemir, E. 2009.Modeling of coal bed methane (CBM) production and CO₂ sequestration in coal seams.Internat. J. Coal Geol. 77:145–52.
- Park, K.H., J.H.Jeon, K.H. Jeon, J.H. Kwag, y D.Y. Choi. 2011. Low greenhouse gas emissions during composting of solid swine manure. Anim. Feed Sci. Technol. 166:550–556.
- Patra, A.K., 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. J. Sci. Food Agric. 90: 2700-2708.
- Patra, A.K., D.N. Kamra y N. Agarwal. 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. J. Sci. Food Agric.90:511–520.
- Patra, A.K., y J. Saxena. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. Nutr.Res. Rev. 22:204–219.
- Patra, A.K., y J. Saxena. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. J. Sci. Food Agric. 91:24–37.
- Patra, A.K., y Z. Yu. 2012. Effect of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations.Appl. Environ. Microbiol. 78:4271-4280.
- Pressman, B.C. 1976.Biological applications of ionophores. Ann. Rev. Biochem. 45:501-529.
- Raco, B., R. Battaglini y M. Lelli. 2010. Gas emission into the atmosphere from controlled landfills: an example from Legoli landfill (Tuscany, Italy). Environ.Sci. and Pollut. Res. 17:1197–206.
- Rafiu, O., Z.Z. Yusuf, A.H. Noor, M.A. Abba, H.M. Abu y M.D. Fadhil. 2012. Methane emissions by sectors: A comprehensive review of emission sources and mitigation methods. Renew. Sustain. Ener.Rev.16:5059–5070.
- Relling, A.E., y G.A. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Cátedra de fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la plata.

- Rivera, M.A. 1999. El cambio climático. México: Colección Tercer Milenio, CNCA.
- Rumpler, W.V., D.E. Johnson, y D.B. Bates. 1986. The effect of high dietary cation concentrations of methanogenesis by steers fed with or without ionophores. *J. Anim. Sci.* 62:1737-1741.
- Rusell, R. 2007. The greenhouse effect & greenhouse gases. http://www.windows2universe.org/earth/climate/greenhouse_effect_gases.html. Consultado Sep. 26, 2012.
- Russel, R. 2007. The greenhouse effect and greenhouse gases. Windows to the Universe: University Corporation for Atmospheric Research.
- Russell, J.B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. *J. Anim. Sci.* 64:1519-1525.
- Russell, J.B., y H.J. Strobel. 1989. Effect of ionophors on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1-6.
- SAS. 2004. User's Guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute, Cary, N.C. U.S.A.
- Schelling, G.T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58:1518-1527.
- Shahabadi, M.B., Yerushalmi L, y Haghghat F. 2010. Estimation of greenhouse gas generation in wastewater treatment plants – Model development and application. *Chemosphere.* 78:1085–92.
- Smith, A.H., E. Zoetendal y R.I. Mackie. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb. Ecol.* 50:197–205.
- Spanghero, M., C. Zanfi, E. Fabbro, N. Scicutella y C. Camellini. 2008. Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:364–374.
- Stewart, C.S., H.J. Flynt y M.P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic and Professional, New York, NY. pp. 10–72.
- Su, S., J. Han, J. Wu, H. Li, R. Worrall y H. Guol. 2011. Fugitive coal mine methane emissions at five mining areas in China. *Atmosph. Environ.* 45:2220–2232.

- Tager, L.R. y M. Krause. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2455–2464.
- Tavendale, M.H., L.P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G.T. Attwood y S. Sivakumaran. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:403–419.
- Teixeira, B., A. Marques, C. Ramos, C. Serrano, O. Matos, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, J. A. Saraiva y M. L. Nunes. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J. Sci. Food Agric.* 93: 2707-2714.
- Tekippe, J.A., A.N. Hristov, K.S. Heyler, T.W. Cassidy, V.D. Zheljazkov, J.F.S. Ferreira, S.K. Karnati y G.A. Varga. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:5065–5079.
- Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan y J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminal feeds. *Anim. Feed sci. Technol.* 48:185-197.
- Tokura, M., I. Changan, K. Ushida y Y. Kojima. 1999. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microbiol.* 39:123-128.
- Ultee, A., E.P.W., Kets y E.J., Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4606–4610.
- Ultee, A., M. Bennik y R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561–1568.
- Valdez, F.R., L.J. Bush, A.L. Goetsch y F.N. Owens. 1986. Effect of steroidal sapogenins on rumen fermentation and on production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:1568–1575.
- Van Kessel, J.A.S., J.B. Russell. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *Microbiol. Ecol.* 20:205–210.
- Van Soest, P.J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, O. & B. Books, Oregon. 12:40-41.

- Vijaya VenkataRaman, S., S. Iniyam y R. Goic. 2012. A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renew. Sustain. Ener.Rev.* 16:878–97.
- Vogels, G.D., W.F. Hoppe y C.K. Stumm. 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 608–612.
- Wallace, R.J., L.C. Arthaud yJ.Newbold. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:762–1767.
- Wallace, R.J., N.R. McEwan, F.M. McIntosh, B. Teferedegne y C.J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15:1458–1468.
- Walsh, S.E., J.Y. Maillard, A.D. Russell, C.E. Catrenich, D.L. Charbonneau y R.G. Bartolo. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94:240–427.
- Wang, T., A. Geng, X. Li, H. Wang, Z. Wang y L. Qiufen. 2011. A prediction model of oil cracked gas resources and its application in the gas pools of Feixianguan Formation in NE Sichuan Basin, SW China. *J. Geol. Res.* 2011:1-11.
- Wang, C.J., S.P. Wang y H. Zhou. 2009. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*148:157-166.
- Westerhold, M. C. 2013. Essential oil effects on rumen fermentation, animal performance, and meat quality of beef steers. M. Sc. Thesis. University of Missouri-Columbia.E.U.A.
- Williams, A.G., S.E. Withers yK.N. Joblin. 1994. The effect of cocultivation with hydrogen-consuming bacteria on xylanolysis by *Ruminococcusflavefaciens*.*Curr.Microbiol.* 29:133–138.
- Williams, C.M., J.S. Eun, J.W. MacAdam, A.J. Young, V. Fellner y B.R. Min. 2011. Effect of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms.*Anim. Feed Sci. Technol.* 166:364 – 372.
- Wink, M., y, O. Schimmer. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink, M. (Ed.), *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 17–112.

- Wolin, M., T. Miller y C. Stewart. 1997. Microbe-microbe interactions. In The rumen microbial ecosystem (ed. P Hobson and C Stewart), pp. 467–491. Chapman & Hall, London.
- Wood, T.A., R.J. Wallace, A. Rowe, J. Price. D.R. Yañez-Ruiz, P. Murray y C.J. Newbold. 2009. Encapsulated fumaric acid as a feed ingredient to decrease ruminal methane emissions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152:62-71.
- Xiaoli, C., L. Ziyang, T. Shimaoka, H. Nakayama, Z. Ying y C. Xiaoyan. 2010. Characteristics of environmental factors and their effects on CH₄ and CO₂ emissions from a closed landfill: An ecological case study of Shanghai. *Waste Management.* 30:446–451.
- Zhang, L., D. Yu, X. Shi, D.C. Weindorf, L. Zhaoy W. Ding. 2009. Simulation of global warming potential (GWP) from rice fields in the Tai-Lake region, China by coupling 1:50,000 soil database with DNDC model. *Atmospheric Environment.* 43:2737-2746.
- Zhou, Z., Q. Meng y Z. Yu. 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundance of methanogen and cellulytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2634-2639.