

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE METANO EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL
MEDIANTE EL USO DE ÁCIDO 3-NITRO-1-PROPIÓNICO**

POR:

Q.B.P. PEDRO ANTONIO OCHOA GARCÍA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN NUTRICIÓN ANIMAL**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

AGOSTO DE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Mitigación de la emisión de metano en la fermentación ruminal mediante el uso de ácido 3-nitro-1-propiónico. Tesis presentada por Pedro Antonio Ochoa García como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Producción Animal y Recursos Naturales, 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

Agosto 11 de 2017

Fecha

Comité:

D. Ph. Agustín Corral Luna
Ph. D. Robin C. Anderson
Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida
Ph. D. Oscar Ruiz Barrera

© Derechos Reservados
PEDRO ANTONIO OCHOA GARCÍA
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO
R. ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453

AGOSTO 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la culminación de este proyecto de investigación a mi familia. He encontrado en ustedes amor, alegría y la motivación que no conocí antes.

De igual manera, agradezco a mis padres y hermanos. Son ustedes el núcleo de mí ser, me han llevado de la mano en gran parte de mi desarrollo personal, no tengo como entregarles algo a cambio de lo ofrecido y espero el orgullo sea la mejor moneda.

Agradezco de gran manera a mi asesor de tesis, quien a pesar de los inconvenientes presentados en la culminación de este proyecto siempre encontró la mejor solución, también agradezco sus consejos, su calidad humana y su amistad. Extiendo este agradecimiento a mis asesores externos e internos, a los alumnos de licenciatura involucrados en el desarrollo experimental, a mis colegas de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH, son todos un ejemplo y una motivación para dar mi mayor esfuerzo y obtener resultados.

Agradezco también el apoyo económico proporcionado por el CONACyT a través de la beca No. 385352, a los representantes del comité académico por medio de los cuales se me facilitó una estancia en el USDA, a la FZYE y la UACH que me permitieron la realización de cada una de las actividades de desarrollo, investigación y ponencia.

Gracias a todos.

DEDICATORIA

Esta obra va dedicada a mi familia, mi esposa e hijo, por el amor, la sinceridad, apoyo y paciencia que me han brindado. Pocos motivos en mi vida he encontrado como el poderles brindar felicidad, paz y amor. Espero que el esfuerzo que se imprime en estas páginas sea un ejemplo para su desarrollo personal y profesional, tengo fe en ustedes y todo mi apoyo.

Dedico esta obra a mis padres, quienes han estado conmigo en cada paso que doy. A mi padre por sus consejos, por hacer ese esfuerzo y dar su opinión acerca del rumbo que deben llevar las cosas. A mi madre, quien no me permitirá nunca dejar a un lado mi educación. A mis hermanos, que muy a su manera son un apoyo importante.

A mi asesor de tesis que encontré en mí a una persona capaz de llevar a cabo este proyecto. A mis colegas y amigos, quienes con tan solo estar ahí me han motivado a seguir adelante, me han compartido alegría, conocimiento y experiencias.

Por último, dedico esta obra a la memoria de cada uno de mis familiares, quienes ya no se encuentran con nosotros. Quienes con su partida nos han mostrado lo valioso que es brindar un poco de felicidad y apoyo. Me llevo gratos recuerdos y el orgullo de haber formado parte de su familia.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 20 de julio de 1988 en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

- | | |
|-----------|--|
| 2006-2010 | Estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas. |
| 2011 | Coautor de la tesis: "Factores de riesgo asociados a síndrome metabólico en una población de adolescentes menonitas de la Cd. De Cuauhtémoc, Chih."

Ponente en 14 ^{vo} Congreso de investigación en salud pública y XI Congreso nacional de química clínica y medicina de laboratorio. Expo-Lab León 2011. |
| 2011-2012 | Estudiante Graduado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. |
| 2015 | Estancia de Investigación en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica. |
| 2014-2016 | Estudiante Graduado del Programa de Maestría en Ciencias de la Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. |

RESUMEN

MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE METANO EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL MEDIANTE EL USO DE ÁCIDO 3-NITRO-1-PROPIÓNICO

POR:

Q.B.P. PEDRO ANTONIO OCHOA GARCIA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Presidente: D. Ph. Agustín Corral Luna

La metanogénesis es un proceso metabólico que permite al ecosistema ruminal la habilidad de mantener una presión de hidrógeno adecuada para la función digestiva. Sin embargo, la metanogénesis ruminal es un proceso ineficiente, permite la pérdida de entre 4 a 12 % de la energía neta consumida por el rumiante. Recientemente se han demostrado que compuestos nitrogenados como el nitroetano, 2-nitroetanol, 2-nitro-1-propanol y el ácido 3-nitro-1-propionico son capaces de inhibir la producción de metano durante cultivos *in vitro*; sin embargo, la dosis de suplementación óptima no ha sido determinada. En el presente estudio, el compuesto natural ácido 3-nitro-1-propionico (3NPA) fue suplementado en concentraciones de 0, 3, 6, 9 y 12 μM a una mezcla de microorganismos ruminales *in vitro* recién colectados. El análisis de los productos de fermentación al transcurrir las 24 h reveló que la producción de metano se redujo de manera dosis dependiente de 29 a 96% ($P < 0.05$), comparado con la cantidad producida por los controles ($15.03 \pm 0.88 \mu\text{mol mL}^{-1}$

de líquido incubado). Los efectos principales del tratamiento también fueron observados en la cantidad total de gas, ácidos grasos volátiles totales y la tasa de degradación del 3NPA, el cual varió de 0.07 a 0.30 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Estos cambios indican que la eficiencia calórica de fermentación no fue comprometida por el tratamiento. Estos resultados reflejan en gran manera los beneficios de la inclusión de 3NPA como agente antimetanogénico; sin embargo, su suplementación y aceptación en sistemas de producción de rumiantes *in vivo* es uno de los retos por resolver.

ABSTRACT

MITIGATION OF METHANE EMISION FROM RUMINAL FERMENTATION WITH THE USE OF 3-NITRO-1-PROPIONIC ACID

BY:

PEDRO ANTONIO OCHOA GARCIA

Methanogenesis is a metabolic process that allows the rumen ecosystem the ability to maintain the low partial pressures of hydrogen needed for proper digestive function. However, the rumen methanogenesis is also considered an inefficient process, because it can result in the loss of 4 to 12 % of the total energy consumed by the host. Recent studies have shown that some short chain nitrocompounds such as nitroethane, 2-nitroethanol, 2-nitro-1-propanol and 3-nitro-1-propionic acid are capable of inhibiting the production of methane during *in vitro* culture; however, optimal supplementation doses have not been determined. In the present study, the naturally occurring nitrocompound, 3-nitro-1-propionic acid (3NPA) was supplemented in concentrations of 0, 3, 6, 9 or 12 μM to *in vitro* cultures of freshly collected mixed populations of ruminal microbes. Analysis of fermentation products after 24 h of incubation revealed that methane production was reduced in a dose-dependent manner by 29 to 96 % ($P < 0.05$) compared to the amount produced by untreated controls ($15.0 \pm 0.88 \mu\text{mol mL}^{-1}$ of incubated liquid). Main effects of treatment were also observed on amounts of total gas and volatile fatty acids produced and rates of 3NPA degradation, which varied from 0.07 to 0.30 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Changes in production of metabolites

produced indicated that the caloric fermentation efficiency was not compromised by 3NPA treatment. These results clearly reflect the benefits of the inclusion of 3NPA as an antimetagenic agent; however, its supplementation and acceptance in *in vivo* ruminant production systems is one of the challenges to solve.

CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
CONTENIDO	x
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
___Implicación Nutricional y Ambiental de la Producción del Metano	4
___Consecuencias del Efecto Invernadero en el Ambiente.....	5
___Producción de Metano y Disminución de Hidrógeno en el Rumen	5
___Supresión de la Metanogénesis en el Rumen.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
___Diseño del Experimento.....	19
___Determinación de 3NPA	20
___Determinación de la producción y composición total de gas	211
___Determinación de la producción de AGV's	21
___Determinación de Amonio (NH ₃).....	222

___Análisis Estadísticos	222
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
___Degradación del Ácido 3-nitropropiónico y Determinacion de β Alanina.....	23
___Producción de Gas Total.....	26
___Producción de CH ₄ e H ₂	29
___Concentración de Ácidos Grasos Volátiles y Amonio.	345
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	389
LITERATURA CITADA	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tasa de degradación de 3NPA y productos de fermentación de una mezcla de microorganismos ruminales durante un periodo de incubación de 24 h.....	25

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Degradación de 3NPA durante 24 h de incubación a diferentes tiempos de muestreo.....	24
2	Gas total producido por una mezcla de microorganismos ruminales después de 24 h de incubación con diferentes niveles de 3NPA.....	29
3	Metano (A) e hidrogeno (B) acumulado por una mezcla de microorganismos ruminales después de 24 h de incubación con diferentes niveles de 3NPA.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cromatografía de capa fina de una mezcla de microorganismos ruminales después de 24 h de incubación bajo diferentes niveles de 3NPA.....	28

INTRODUCCION

La metanogénesis ruminal es una vía metabólica en la que tiene lugar la síntesis de metano (CH₄) y se desarrolla en el tracto digestivo de animales rumiantes (Zehnder y Brock, 1979). A pesar de que este proceso se considera normal, ya que permite mantener la presión de hidrógeno constante y, con ello, un buen funcionamiento del rumen (Van Nevel y Demeyer, 1996), desde el punto de vista económico, la producción de CH₄ es considerada un proceso ineficiente ya que se pierde entre el 4 y 12 % del total de energía consumida (Johnson y Johnson, 1995). Por otra parte, desde el punto de vista ambiental, el CH₄ emitido a la atmósfera representa un serio problema, ya que es el segundo gas con efecto invernadero producido de forma antropogénica (IPCC, 2007), después del dióxido de carbono (CO₂). Además, el CH₄ es 21 veces más efectivo para atrapar el calor en la atmósfera comparado con el primero (Harper *et al.*, 2007).

Para mitigar estas emisiones, se han propuesto diferentes alternativas entre las que se encuentra el mejoramiento de la productividad animal a través de aspectos como: adición de ingredientes de alta calidad a la dieta (McAllister *et al.*, 1996); manejo en pastoreo (McCaughey *et al.*, 1997) y selección genética (Hegarty *et al.*, 2007), todas alternativas efectivas y durables que deben formar parte de las prácticas a seguir por parte del sector productivo. Cualquiera de estas alternativas se limitará a reducir la producción de CH₄ en un 30%, aproximadamente. Algunos autores sugieren la complementación de estas prácticas con la adición de modificadores de la función ruminal como son: grasas de sobrepaso (Beauchemin *et al.*, 2006); taninos (Carulla *et al.*, 2005); saponinas

(Hess *et al.*, 2003); aceites esenciales (Evans y Martin, 2000; Patra y Yu, 2012) y ionóforos (Callaway *et al.*, 2003).

Actualmente se sabe que la adición de grasa de sobrepaso reduce de manera efectiva la producción de CH₄ en estudios *in vivo*, sin embargo, su aplicación puede ser muy costosa para los productores. Por otra parte, los aceites esenciales y otros compuestos secundarios derivados de plantas, no son selectivos contra microorganismos metanógenos y su efecto se extiende a toda la microbiota ruminal, incluyendo la benéfica. Este efecto trae como consecuencia una disminución de la digestibilidad de nutrientes y productividad del animal en condiciones *in vivo* (Patra y Yu, 2012). Por otro lado, la suplementación con ionóforos ha sido prohibida en los países integrantes de la Unión Europea, esto como respuesta a la aparición de residuos de estos compuestos en productos alimenticios de origen animal y a que generan resistencia bacteriana (Gustafson y Bowen, 1997).

Bajo estas circunstancias, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que permitan reducir las emisiones de CH₄ producidas por el metabolismo de los rumiantes. Estas estrategias de mitigación deben siempre evitar el alza de los costos de producción y manejo, y al mismo tiempo garantizar la inocuidad de los productos alimenticios de origen animal. En este sentido, diversos estudios (Anderson *et al.* 2003 y 2008; Gutiérrez-Bañuelos *et al.* 2008 y Bozic *et al.*, 2009) han demostrado que ciertos nitrocompuestos de cadena corta como el nitroetano (NE), 2-nitroetanol (2NEOH), 2-nitro-1-propanol (2NPOH) y ácido 3-nitropropiónico (3NPA) son capaces de inhibir la producción de CH₄ en

condiciones *in vitro*, mientras que el NE y 2NPOH lo han hecho en estudios *in vivo* (Anderson *et al.*, 2006). No obstante, una desventaja en la aplicación de algunos nitrocompuestos como el NE, 2NEOH y 2NPOH es que ninguno puede ser llevado a una escala comercial en el corto plazo, ya que son compuestos sintéticos, con poca investigación a nivel de inocuidad y los productos finales de su reducción (aminoetano, etanolamina y aminopropanol, respectivamente) tienen poco o nulo valor nutricional para el rumiante. Contrario a esto, el 3NPA es un compuesto que se encuentra de manera natural en algunos hongos y plantas, y ha demostrado ser efectivo para reducir la producción de CH₄ hasta en un 90 % bajo condiciones *in vitro* (Anderson *et al.*, 2008), y su metabolización lleva a la producción de β-alanina, el cual es un aminoácido no esencial que puede ser utilizado como nutriente por el rumiante. Sin embargo, el nivel de suplementación de 12 mM, evaluado por Anderson *et al.* (2008), resultó ser extremadamente costoso para ser usado en condiciones *in vivo*. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de 3NPA a diferente concentración sobre la producción de CH₄ y parámetros de fermentación.

REVISION DE LITERATURA

Implicación Nutricional y Ambiental de la Producción del Metano

Las emisiones globales de gases de efecto invernadero (GEI) debido a actividades humanas se han incrementado desde el inicio de la revolución industrial, con un aumento del 70% entre 1970 y 2004 (IPCC, 2007). El CO₂ es el principal componente de los GEI emitidos a la atmosfera por actividades antropogénicas ya que representan el 76.7% del total. En segundo lugar se encuentra el CH₄ ya que este representa el 14.3% según Steinfeld *et al.* (2006).

El CH₄ puede afectar el clima directamente a través de su interacción con la energía infrarroja de onda larga, y de forma indirecta a través de las reacciones de oxidación atmosférica que producen CO₂. Del total de CH₄ emitido a la atmosfera por fuentes antropogénicas, el sector agrícola contribuye con alrededor del 60% del total. De esto, alrededor del 25% proviene de la fermentación entérica del ganado (Olivier *et al.*, 2005), lo que representa alrededor de 80 millones de toneladas anualmente. La mayor parte del CH₄ entérico, se origina a partir de la fermentación microbiana de hidratos de carbono en el rumen y tracto digestivo inferior. La producción de CH₄ en rumiantes también representa una pérdida de energía bruta de los alimentos que oscila entre 2 a 12%, dependiendo del tipo de dietas (Johnson y Johnson 1995). Por lo tanto, la inhibición de la producción de CH₄ en el rumen, se considera un área de oportunidad para eficientar la utilización de la energía consumida por el ganado. Además de reducir las implicaciones ambientales que la producción de CH₄ tiene.

Consecuencias del Efecto Invernadero en el Ambiente

En años recientes, la temperatura global promedio ha ido en aumento, esto como consecuencia de la acumulación de GEI y se estima que para el año 2030 el planeta será 1-2 °C más caliente y que el nivel del mar aumente entre 17 y 25 cm (Moss *et al.*, 2000), lo cual afectara de diversas maneras a todos los organismos vivos.

Consecuencias humanas y animales. Una de las principales repercusiones del cambio climático será el cambio en la distribución y suplementación del agua. Dicho cambio en la distribución de este importante liquido generara cambios en la distribución de las áreas húmedas en el mundo (Patra y Yu, 2012). Por otra parte, los cambios en la temperatura causan una disminución del rendimiento de productos de origen vegetal y animal (Nelson *et al.*, 2009) y su consecuente repercusión económica.

Producción de Metano y Disminución de Hidrogeno en el Rumen

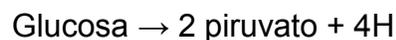
Fermentación en el rumen. La fermentación de los carbohidratos es un proceso oxidativo que se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas. Estos ocurren en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas dando como producto final piruvato y cofactores reducidos, como el Nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH). Estos cofactores reducidos tienen que ser reoxidados a NAD para completar la fermentación de azúcares evitando con ello llegar a una acumulación de las formas reducidas. El NAD se regenera por transferencia de electrones a aceptores distintos al oxígeno (CO₂, sulfato, nitrato, fumarato). La

producción de H₂ es un proceso termodinámicamente desfavorable que es controlada por el potencial del portador de electrones (Wolin *et al.*, 1979).

Aunque H₂ es uno de los principales productos finales de la fermentación por protozoos, hongos y mono cultivos puros de algunas bacterias, no se acumula en el rumen debido a que se utiliza inmediatamente por otras bacterias que están presentes en el ecosistema microbiano mixto como lo son las bacterias metanógenas. La colaboración entre especies fermentadoras y bacterias utilizadoras de H₂ se llama "transferencia de hidrógeno entre especies" (Iannotti *et al.*, 1973). Algunas asociaciones físicas entre especies fermentativas y utilizadoras de H₂ pueden facilitar la transferencia de hidrogeno entre especies en el rumen.

El hidrogeno metabólico en forma de protones reducidos (H) también se pueden utilizar durante la síntesis de ácidos grasos volátiles o incorporándolos a la materia orgánica microbiana. La estequiometría de las principales vías de fermentación anaerobia se puede resumir como sigue:

2H producido en reacciones:



(Via Embden-Meyerhof-Parnas)



2H utilizando en reacciones:



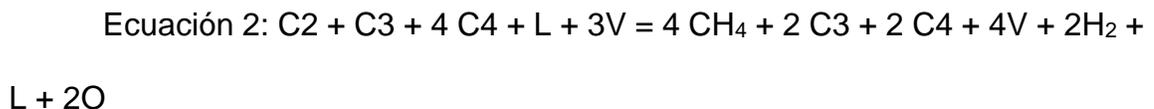


En el rumen, la formación de CH₄ es el principal modo de eliminación de hidrógeno y también es beneficiosa para la degradación de los hidratos de carbono de la pared celular. Cuando H₂ no se utiliza correctamente por los metanógenos, el NADH puede ser reoxidado por deshidrogenasas de las bacterias fermentadoras para formar etanol o lactato. Esta situación, se presenta principalmente en animales alimentados con grandes cantidades de carbohidratos de rápida fermentación y puede considerarse como anormal y representa una disfunción del ecosistema ruminal.

Suponiendo que la cantidad de 2H producido (2Hp) es igual a 2H utilizado (2HU) sobre una base molar, (Demeyer y Van Nevel 1975) propusieron la siguiente ecuación obtenida de las reacciones anteriores:



Si la producción de H₂, lactato (L), valerato (V), y el consumo de oxígeno (O₂) se consideran, la ecuación (1) se puede convertir en:



La tasa de recuperación de hidrógeno metabólico que se calcula como 2HU/2Hp, varía entre 78 y 96% en el rumen para dietas de forraje (Demeyer, 1991). Considerando una media de recuperación de hidrógeno de 90%, entonces la siguiente ecuación permite el cálculo de la producción de CH₄:

Ecuación 3: $CH_4 = (1.8 \cdot C_2 - 1.1 \cdot C_3 + 1.6 \cdot C_4) / 4 = 0,45 C_2 - 0.275 C_3 + 0,40 C_4$

Claramente, la ecuación (3) indica que el porcentaje molar de ácidos grasos volátiles (AGV) influye en la producción de metano en el rumen. Acetato y butirato promueven la producción de metano mientras que la formación de propionato puede ser considerada como una vía competitiva para el uso de hidrógeno en el rumen. Estos cálculos se han confirmado *in vitro*, donde los productos finales se pueden cuantificar fácilmente.

En 1969 Van Kessel y Russell observaron que usando muestras de fluido ruminal proveniente de animales alimentados con dietas a base de forrajes, los metanógenos ruminales pierden la capacidad de utilizar H_2 cuando hay reducción en el pH ($\leq 5,5$), dando lugar a la acumulación de H_2 libre en la fase gaseosa. Por lo tanto en dietas a base de forraje con pH bajo conduce a una disminución en la metanogénesis independiente de la formación de propionato. Por el contrario, las bacterias fermentadoras de almidón pueden competir contra metanógenos para el uso de hidrógeno mediante la producción de grandes cantidades de propionato (Russel, 1998).

Es importante señalar que el ecosistema microbiano involucrado en la formación propionato difiere con las condiciones de la dieta. La bacteria celulolítica *Fibrobacter succinogenes* es la principal productora de propionato a través de la vía de succinato en dietas altas en forrajes, mientras que en dietas altas en almidón, el lactato es el principal intermediario en la producción de propionato. A diferencia de las bacterias celulolíticas y metanógenas, las

bacterias lácticas son conocidos por ser tolerantes de pH bajo, siendo capaces de utilizar H₂ y ser competitivos con los metanógenos, incluso en condiciones de pH desfavorables (Moss *et al.*, 2000).

Microbiología y metanogénesis. En la naturaleza se sabe que existen alrededor de 28 géneros y 113 especies de metanógenos, de los cuales, sólo siete especies se han cultivado desde el rumen. Estos son *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile*, y *Methanoculleus olentangyi*. También *Methanosarcina spp.* ha sido cultivada en muestras ruminales, aunque esta especie no representa una parte importante de los microorganismos encontrados en el rumen. Los estudios moleculares revelan que los miembros de la familia Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter spp.*, *Methanobacterium spp.* y *Methanosphaera spp.*) son los miembros dominantes (30% a 99%) de las arqueas en el rumen. Los miembros del orden Methanomicrobiales (*Methanomicrobium spp.*) son menos abundantes (0% a 54%), y miembros del orden Methanosarcinales (que incluye *Methanimicrococcus*) son poco frecuentes (2% a 3%).

La evaluación de la metanogénesis ruminal, revela que dos tipos de bacterias son los responsables de llevarla a cabo. Los metanógenos de crecimiento lento que producen CH₄ a partir de acetato (*Methanosarcina*) y aquellos de crecimiento rápido (tiempo de generación de 4-12 h) que reducen CO₂ utilizando H₂. En el rumen, el CH₄ se produce sobre todo por los metanógenos de rápido crecimiento ya que la tasa de pasaje de la digesta es

demasiado rápida como para permitir el establecimiento de las especies de crecimiento lento.

Fermentación en el ciego. En los rumiantes, las grandes cantidades de materia orgánica pueden pasar por el rumen y ser digeridos en el intestino posterior si no hay la digestión en el intestino delgado o si la digestión es incompleta. Así las dietas de forraje molido y aquellas ricas en almidón pueden suministrar grandes cantidades de materia orgánica digestible en el intestino grueso. Se estima que aquí se digiere entre 10 y 30 % de la materia orgánica. Debido a que el intestino grueso es el único compartimiento de fermentación en el tracto digestivo de los monogástricos, este desempeña un papel esencial especialmente en herbívoros. Sin embargo, las bacterias anaeróbicas en el intestino grueso no son muy diferentes de los que se encuentran en el rumen (Julliard, 1992). Al igual que en el rumen, los metanógenos de la fermentación en el cólon utilizan H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 . Cuando la fermentación no metanogénica se produce en el intestino grueso, el H_2 se utiliza para reducir el CO_2 en acetato.

Por ello, el uso de H_2 es de interés para la nutrición animal ya que el acetato es absorbido en la sangre y se utiliza como fuente principal energía por los rumiantes, mientras que el metano se pierde desde el animal. Como consecuencia, se han realizado varios intentos para reducir la producción de metano a partir de la fermentación ruminal y aumentar la acetogénesis. De forma contraria a los metanógenos, las bacterias acetogénicas son capaces de utilizar fuentes distintas de hidrógeno para su abastecimiento de energía, lo que explica

por qué su concentración puede ser alto en el rumen, mientras que la acetogénesis es insignificante.

Demeyer y De Graeve (1991) demostraron que la adición de H_2 a la fase gaseosa de fermentadores inoculados con digesta ruminal y alimento, tuvo poco efecto sobre la producción de AGV (-4 a 7 %), sin embargo, la metanogénesis incremento ($P < 0.05$) alrededor de 94 %. Por otra parte, cuando estos fermentadores fueron suplementados con H_2 , la producción de acetato, propionato, butirato y CH_4 se incrementan 10, 14, 14 y 67 %, respectivamente. El aumento en la producción de CH_4 fue menor que el observado únicamente con digesta ruminal. Estos resultados indican que la metanogénesis es la principal vía para el uso H_2 en el rumen en comparación con el uso para la síntesis de propionato o butirato. Cuando están presentes los metanógenos, la metanogénesis todavía sigue siendo el principal disipador de H_2 en el ciego, pero su contribución es menor en comparación con el rumen. Por el contrario, la contribución de AGVs es más grande en el ciego.

Determinaciones individuales de la producción de metano indican que hay grandes variaciones entre los animales en las mismas condiciones dentro de un rebaño (Johnson y Johnson, 1995). Hay variaciones insignificantes entre los microorganismos implicados en la transferencia de hidrógeno, comportamiento alimentario y la fisiología animal los cuales son los factores determinantes de las poblaciones microbianas que intervienen en la producción y uso del hidrógeno, lo que explica tal efecto en los animales.

Supresión de la Metanogénesis en el Rumen

Aunque las investigaciones científicas en el área, han explorado muchas de las opciones de mitigación de la producción de CH₄ posibles, las regulaciones internacionales actuales han llevado a la búsqueda de alternativas naturales, que eviten la presencia de residuos en los alimentos y que nutricionalmente proporcionen compuestos de valor energético.

Dentro de estos compuestos se encuentran saponinas, taninos, aceites esenciales y muchos otros metabolitos derivados orgánicos, los cuales muestran potencial de mitigación de CH₄ (Kamra *et al.*, 2008; Patra *et al.*, 2008; Patra y Saxena, 2010). Estos metabolitos reducen la producción de CH₄ a través de un efecto directo sobre los metanógenos, la reducción de la digestión MO, y la modificación de la fermentación en el rumen.

Saponinas. Cada vez hay más pruebas que sugieren que la adición de saponinas en las dietas podría reducir la producción de CH₄, debido a una posible disminución en el número de protozoos y por consecuencia el número de bacterias metanogénicas. Las saponinas de *Sapindus saponaria* suprimen la producción de CH₄ en un 20% sin afectar los números de metanógenos en condiciones *in vitro* usando RUSITEC (Hess *et al.*, 2003) o en corderos *in vivo* (Hess *et al.*, 2004). Se ha observado que el efecto de *S. saponaria* es más pronunciado cuando se provocaba la defaunación (29%) que bajo condiciones normales (14%), lo que indica que la producción de CH₄ no está del todo asociada al número por protozoos (Hess *et al.*, 2003). Las actividades inhibitoras de algunas saponinas sobre la metanogénesis dependen de la composición de la

dieta y niveles de estas. Por ejemplo, las saponinas de *Sapindus rarak* en una concentración de 4 mg mL⁻¹, reducen la concentración de ARN metanógeno, mientras que niveles más bajos no tienen ningún efecto (Wina *et al.*, 2005).

No obstante, uno problema con la utilización de saponinas o plantas que las contienen, es que la actividad anti protozoaria es transitoria (Patra y Saxena 2009). Esto no significa que los protozoos adquieran resistencia a estos compuestos (Newbold *et al.* 1997), sino que es posible que las poblaciones bacterianas del rumen degraden las saponinas (Newbold *et al.*, 1997; Patra y Saxena, 2009). Estos estudios proporcionan evidencia de que con el tiempo, las poblaciones microbianas del rumen son capaces de adaptarse a las saponinas, lo que representa un desafío para la aplicación práctica de estos compuestos.

Taninos. Diferentes fuentes de taninos han demostrado disminuir la producción de CH₄ tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* dependiendo de la dosis. Por ejemplo, la adición de Acacia suprime hasta 10 % la producción de CH₄ en ganado ovino (Carulla *et al.*, 2005) y en ganado bovino hasta en 30 % (Grainger *et al.*, 2009). La producción de CH₄ también se inhibió hasta 90% bajo condiciones *in vitro* por la inclusión de extracto de metanol de pericarpio de *Terminalia chebula* y en ovejas suplementadas con 10 g kg⁻¹ MS (Patra *et al.*, 2010a y b), lo que podría deberse a la presencia de taninos en estas frutas. Por su parte Min *et al.* (2005) encontraron que el tanino de quebracho (75 %) incluido en concentraciones de 1 a 2 g L⁻¹ provocó una reducción de 12.3 a 32.6 % en la producción de CH₄ bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, ganado pastoreando trigo en estado vegetativo temprano no mostraron efecto anti-metanogénicas

(Min *et al.*, 2006). Más recientemente, Bhatta *et al.* (2009) reportaron que los taninos de quebracho inhibieron la producción de CH₄ linealmente (13% a 45%) con dosis crecientes (5% a 25% de sustratos).

Aceites esenciales y compuestos orgánicos de azufre. Diversas investigaciones han reportado el efecto de algunos aceites esenciales (AE) sobre la producción de CH₄. Evans y Martin (2000) observaron que el timol un componente principal del AE de plantas tomillo y orégano, era un fuerte inhibidor de CH₄ *in vitro* cuando se usa a dosis de 400 mg L⁻¹. Sin embargo, las concentraciones de acetato y propionato también disminuyeron. Los extractos de metanol y etanol de *Foeniculum vulgare* y *Syzygium aromaticum* inhiben la producción de CH₄ *in vitro* (Patra *et al.*, 2006). No obstante, los extractos de *S. aromaticum*, también redujeron la capacidad de degradación de la materia seca, mientras que los extractos de *A. sativum* y *F. vulgare* no tuvieron efecto sobre este parámetro (Patra *et al.*, 2010a). Busquet *et al.*, 2005 observaron que con compuestos orgánicos de azufre, como el aceite de ajo y cuatro de sus componentes principales (sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo, mercaptano de alilo, y alicina), se redujo la producción de CH₄ entre 74 y 69 %. Esto sugiere que el aceite de ajo y disulfuro de dialilo podrían deber su efecto a su acción directa en el rumen. En un experimento con ovejas alimentadas con paja de trigo y concentrado (1:1), la inclusión de *Allium sativum* en 10 g kg⁻¹ de MS también redujo la producción de CH₄ e incremento la digestibilidad de la fibra (Patra *et al.*, 2010b). Un número limitado de estudios disponibles muestra el efecto directo de las AE en arqueas del rumen. Así, McIntosh *et al.*, (2003) en un estudio con

Methanobrevibacter smithii observaron que una concentración de 0,16 ml L⁻¹ no inhibió el crecimiento, sin embargo, la inhibición se produjo a una dosis de 1.0 mL L⁻¹. Ohene- Adjei *et al.* (2008) también reportan que el ajo y los suplementos de aceite de enebro en la dieta a base de cebada no afectaron el número total de archeas metanogénicas cuantificadas por 16S rRNA. Curiosamente, el análisis filogenético indica que la suplementación con aceite de canela, ajo y enebro reducen la proporción de microorganismos asociados al grupo *M. ruminantium*, la cual fue más marcada en el caso de aceite de enebro. Por el contrario, los clados afiliados a *Methanosphaera stadtmanae*, *M. smithii* y algunos grupos no cultivables, aumentaron en los tratamientos suplementados. Esto sugirió que los AE aumentaron la distribución filogenética de archeas metanogénicas, que puede ser el resultado de cambios en las especies de protozoos asociados (Ohene-Adjei *et al.*, 2008). Parece que la disminución en la producción de CH₄ por el uso de dosis bajas de AE, podría estar asociado con una alteración en las comunidades de archeas o en la actividad de los genes que producen CH₄ (Ohene-Adjei *et al.*, 2008). En general, aunque los fitoquímicos parecen prometedores para mitigar las emisiones de CH₄ en los rumiantes, los resultados no son consistentes entre diferentes estudios, posiblemente debido a las grandes variaciones en su composición química, dosis y composición de la dieta (Patra y Saxena, 2010). Por ello, se necesitaría una gran cantidad de investigación sobre la base de relación estructura-actividad para la aplicación práctica de fitoquímicos.

Compuestos químicos. Desde hace ya algún tiempo, los análogos de metano halogenados como cloroformo y otros cloruros han sido usados para inhibir la producción de CH₄ en los rumiantes. Sin embargo, se descubrió que pueden causar daños en el hígado y la muerte de los animales después de un largo período de alimentación. Por lo tanto, parece que no son adecuados para su uso en la práctica. En 1999 se reportó que el efecto de tricloroacetamida y tricloroetil adipato sobre la metanogénesis ruminal suele ser transitorio. Sin embargo, una combinación de bromoclorometano y ciclodextrina α resultaron ser más estables y capaces de suprimir las emisiones de CH₄ en los rumiantes durante un período prolongado (McCrabb *et al.*, 1997). García-López *et al.* (1996) suplementaron yodopropano en condiciones *in vitro*, y Mohammed *et al.* (2004) en novillos y observaron que la producción de CH₄ se redujo, sin afectar la digestibilidad. Por su parte, Lila *et al.* (2004) usando maleato de dialilo bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* demostraron su capacidad para suprimir la producción de CH₄, sin observar adaptación aparente de los microorganismos ruminales a los compuestos químicos.

Nitrocompuestos. Desde 1993 Anderson *et al.* proponen una posible estrategia alternativa para reducir la producción de CH₄ ruminal, la cual consiste en desviar el flujo de sustratos reductores necesarios para la metanogénesis hacia aceptores alternativos. Las nitrotoxinas tales como el ácido 3-nitro-1-propionico y el 3-nitro-1-propanol fueron de los primeros compuestos de origen orgánico puestos a prueba para cumplir el objetivo de mitigar la producción de CH₄ de esta forma. Así mismo, el uso de estos compuestos suponía un valor

agregado ya que el ácido 3-nitro-1-propionico puede ser convertido a β -alanina y el 3-nitro-1-propanol en 3-amino-1-propanol. Sin embargo conscientes de su toxicidad se ha limitado su estudio. Algunos nitrocompuestos tales como nitroetano, 2 nitroetanol, 2-nitro-1-propanol, y el ácido 3-nitro-1-propionico inhibieron la producción ruminal CH_4 *in vitro* (Anderson *et al.*, 2003; 2008) y nitroetano y 2-nitro-1-propanol han demostrado ser efectivos para reducir la producción de CH_4 en condiciones *in vivo* (Anderson *et al.*, 2006; Gutierrez-Bañuelos *et al.*, 2007). Aunque estos estudios sobre agentes antimetanogénicos químicos muestran una alta capacidad para reducir las emisiones de CH_4 , la investigación sobre estos aditivos alimenticios es muy limitada. Si bien, estos compuestos son compatibles para su uso como aditivos antimetanogénicos debido a su alta capacidad para reducir los efectos de gases de efecto invernadero, la suplementación de manera *in vivo* en base a compuestos químicos nitrogenados supone una limitante económica.

Compuestos nitrogenados de derivados orgánicos. Actualmente se conocen algunas plantas y hongos capaces de producir derivados nitrogenados capaces de inhibir la producción de CH_4 , como es el caso de varias especies de plantas leguminosas del genero *Astragalus* o *Coronilla* (Williams, 1977) y algunos hongos como es el caso de las especies de *Penicillium atrovenetum* o *Aspergillus flavus* en donde se producen compuesto como el ácido 3-nitro-1-propiónico y el 3-nitro-1-propanol (Wilson, 1971). La producción de compuestos nitrogenados con propiedades anitmetanogénicas a partir de fuentes alternas como la extracción de plantas o la producción del metabolito a través de hongos

pueden reducir en gran medida los costos de producción del nitrocompuesto. Sin embargo es fundamental conocer los niveles óptimos de suplementación, así como los productos secundarios de la metabolización ya que es necesario conocer sobre sus efectos sobre la salud animal y la presencia de estas sustancias químicas en los productos animales, en esto reside la necesidad de retomar la investigación de la aplicación de fuentes naturales.

MATERIALES Y METODOS

Diseño del Experimento

Los experimentos realizados en esta investigación fueron llevados a cabo en las instalaciones de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicada en el Periférico Francisco R. Almada Km 1, Zootecnia, 33820 Chihuahua, Chihuahua, México. Se evaluó el efecto de la suplementación de 3NPA grado analítico con un 96 % de pureza (Sigma-Aldrich Chemicals Inc., St. Louis, Mo, USA) a concentraciones de 0, 3, 6, 9 y 12 mM sobre una mezcla de microorganismos ruminales durante un periodo de incubación *in vitro* de 24 h. Cada unidad experimental consistió en tubos de 18 x 150 mm, sellados con un tapón de goma, los cuales contenían 9 mL de medio basal (Gutiérrez-Bañuelos *et al.*, 2008), 200 mg de heno de alfalfa finamente molido, 0.3 mL del correspondiente tratamiento o agua destilada para el control. Los tratamientos y el control fueron analizados por triplicado, así como un blanco para la medición de la concentración inicial de AGV's, la cual fue almacenada en congelación hasta su análisis. Los tubos fueron inicialmente inoculados con 1 mL de líquido ruminal colectado de dos vaquillas cruzadas Hereford X Angus provistas de cánula ruminal, las cuales estuvieron alimentadas con una dieta de mantenimiento a base de heno de avena y ensilaje de maíz, antes de la alimentación de la mañana (8:00 a.m.). De cada vaquilla se colectaron 500 mL de líquido ruminal y se depositaron en termos de 500 mL previamente atemperados para ser transportados inmediatamente al laboratorio. El líquido ruminal fue mezclado y filtrado a través de una malla de cuatro capas de tela para

queso y se mantuvo bajo un flujo de CO₂ y manejado mediante técnicas adecuadas de anaerobiosis (Paynter y Hungate, 1968). Los tubos se sellaron con tapón de caucho y aro de aluminio y se incubaron a 39 °C con agitación constante a 110 rpm. Al término de las 24 h de incubación se midió la producción total de gas, y se tomaron muestras para determinar la composición de gas (CH₄ y H₂) y concentración de ácidos grasos volátiles principales (AGV's) y amonio. Durante el periodo de incubación también se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 12 y 24 h para determinar la concentración de 3NPA de los distintos tratamientos a lo largo del periodo de incubación, así como para la determinación cualitativa de β-alanina. Los tubos y alícuotas (1 a 1.5 mL) obtenidas en los periodos de muestreo fueron guardadas a -14 °C para su posterior análisis.

Determinación de 3NPA y producción de β-alanina

Cada alícuota fue descongelada a temperatura ambiente y centrifugada por 10 min a 10,000 x g. El sobrenadante de cada una de las muestras, así como los estándares (50 µl de cada uno) fueron tratados siguiendo una modificación de la técnica utilizada por Majak *et al.* (1992), en donde la muestra a analizar se mezcló con 2.5 mL de H₂O, después se adicionaron 100 µL de NaOH 0.65 M, se mezcló, posteriormente se adicionaron 100 µL de p-nitroanilina diazotizada, se mezcló y por último se adicionaron 2.5 mL de H₂O. La absorbancia de la reacción fue medida a 405 nm, haciendo uso de un espectrofotómetro Multiskan Go® de Thermo Scientific.

La determinación cualitativa de β-alanina se llevó a cabo tomando una muestra de cada tratamiento al finalizar el periodo de incubación, una muestra

control tomada a las 0 h y una muestra de β -alanina pura, para posteriormente someterse a una cromatografía de capa fina siguiendo la metodología utilizada por Anderson *et al.* (1993).

Determinación de la Producción y Composición Total de Gas

La producción total de gas se midió usando un transductor de presión FESTO® (SIEMENS, Munich, Germany), la cual se obtuvo insertando la aguja del equipo en los tapones de goma (de cada tubo) al final del periodo de incubación. La concentración se determinó a partir de una curva estándar. La composición del gas se determinó por cromatografía de gases usando un cromatógrafo GOW-MAC Serie 580, provisto de una columna empacada Carbosphere®, 80/100. 5682PC. Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 20 mL min⁻¹.

Determinación de la Producción de AGV's y Eficiencia Fermentativa

La producción de AGV's se determinó por cromatografía de gases, siguiendo la metodología utilizada por Galyean (1989), en donde 5 mL de la muestra centrifugada fueron mezclados con una mezcla de 1 mL de ácido metafosfórico al 25 % y un estándar interno de ácido 2-etil butírico, sometidos a baño de hielo por 30 min y centrifugados de nuevo a 10,000 x g. Los estándares fueron tratados de la misma forma. Las determinaciones fueron llevadas a cabo en un cromatógrafo PerkinElmer provisto de una columna capilar de acero inoxidable Poropak-Q de 30 m de largo, usando como gas acarreador helio a un flujo de 20 mL min⁻¹.

La eficiencia fermentativa se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Chalupa (1977) y la cantidad de hexosas fermentadas de acuerdo con Wolin (1960).

Determinación de Amonio (NH₃)

Se determinó la producción total de NH₃ mediante la técnica utilizada por Chaney y Marbach (1962), en donde 50 µl de muestra (o estándar) fueron mezclados con 3 mL del reactivo de fenol y 3 mL de hipoclorito. La absorbancia de la reacción fue medida a 630 nm, haciendo uso de un espectrofotómetro Multiskan Go® de Thermo Scientific.

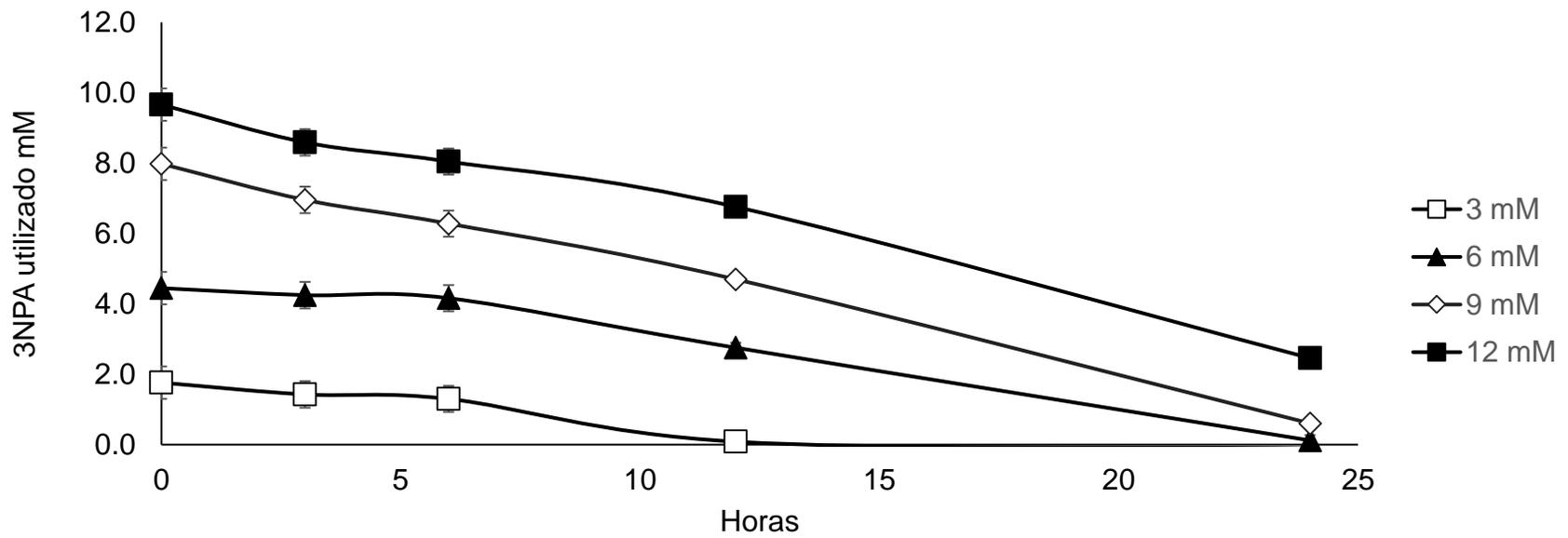
Análisis Estadístico.

Los análisis de los efectos principales de tratamiento para las diferentes variables evaluadas se realizaron ajustando un modelo de clasificación de una sola vía para un diseño completamente al azar. Cuando los efectos de tratamientos resultaron significativos, se realizaron contrastes polinomiales ortogonales. En el caso de los datos de ácidos grasos volátiles, amoníaco e hidrogeno, debido a que los resultados de la prueba de contrastes polinomiales ortogonales dieron significativos para la tendencia de cuarto orden, se optó por una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey (1953). Todos los datos fueron analizados mediante el software analítico SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSION

Degradación del Ácido 3-nitropropiónico

La reducción en la concentración de 3NPA desde las 3 h post incubación en todos los tratamientos indica que éste es metabolizado rápidamente (Gráfica 1), lo que confirma la presencia de bacterias utilizadoras de 3NPA. Sin embargo, la tasa de degradación es mayor a dosis de suplementación altas, alcanzando su máxima tasa a una concentración de 9 mM; concentraciones mayores no promueven un incremento en la tasa de degradación (Cuadro 1). Este comportamiento sugiere que a esta concentración se alcanza la máxima capacidad de la microbiota ruminal para metabolizar el compuesto. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Anderson *et al.* (1993), quienes concluyeron que la capacidad ruminal para metabolizar nitrocompuestos puede ser incrementada mediante la exposición a dosis no letales o suplementación con forrajes que contengan 3NPA. Este comportamiento podría estar dado por un incremento de la población de bacterias denitrificantes como ha sido descrito por Anderson *et al.* (2000), quienes mencionan que el principal microorganismo reductor del compuesto es *Denitrobacterium detoxificans*. Se sabe que *D. detoxificans* es un microorganismo anaerobio obligado, el cual en su proceso respiratorio oxida diversos sustratos como H₂, formiato o lactato para reducir 3NPA a β-alanina (Anderson *et al.*, 1993), así como otros compuestos nitrogenados, los cuales reduce a sus respectivas aminas y de esta manera compete con bacterias metanógenas por la utilización de los reductores necesarios para llevar a cabo la metanogénesis ruminal, lo cual posibilita a estos



Gráfica 1. Degradación de 3NPA durante 24 h de incubación a diferentes tiempos de muestreo. Los valores mostrados son medias \pm una desviación estándar.

Cuadro 1. Tasa de degradación de 3NPA y productos de fermentación de una mezcla de microorganismo ruminales durante un periodo de incubación de 24 h.

Tratamientos	Tasa de degradación		Mediciones del fluido ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)						
	Entre las 0 y 6 h	Entre las 0 y 24 h	VFA totales	Acetato	Propionato	Butirato	Tasa Ac:Pr	Amonio	Eficiencia de fermentación
Control	NA	NA	77.301 ^a	60.667 ^a	13.701 ^a	2.932 ^a	4.453 ^a	10.88	70.93 ^a
3 mM	-0.055 ^a	-0.075 ^a	48.698 ^{db}	36.589 ^b	9.751 ^b	2.358 ^b	3.739 ^b	10.55	72.29 ^a
6 mM	-0.033 ^a	-0.188 ^b	66.291 ^{ab}	47.831 ^c	14.017 ^a	4.442 ^c	3.414 ^c	10.87	73.03 ^a
9 mM	-0.283 ^b	-0.303 ^c	66.987 ^b	48.954 ^c	14.173 ^a	3.858 ^d	3.463 ^c	11.25	72.88 ^a
12 mM	-0.267 ^b	-0.293 ^c	61.544 ^c	43.508 ^d	14.298 ^a	3.737 ^d	3.069 ^d	12.93	73.86 ^b
Valor <i>P</i>	<0.0001	<0.0001	0.0012	0.001	0.0084	0.0031	0.0156	0.955	NA
E.E.	0.0896	0.016	3.172	2.634	0.769	0.282	0.227	0.802	NA

^{abcde} Medias en las mismas columnas con diferente letra tienen una diferencia de $P < 0.05$.

NA "No aplica"

E.E. Error estándar de la media

compuestos para ser aceptores alternativos de electrones (Anderson *et al.*, 1998). En este experimento, la producción de β -alanina determinada cualitativamente (Figura 1), indica que a medida que se incrementó la concentración de 3NPA en el medio, la intensidad de las bandas aumentó, coincidiendo con lo reportado por Anderson *et al.* (1993).

Producción de Gas Total

Después de 24 h de incubación, la cantidad de gas acumulada en los diferentes tratamientos tendió a reducirse, siguiendo una tendencia lineal ($P < 0.01$). Los resultados indican que conforme se incrementó la concentración de 3NPA en el medio, la cantidad de gas producida se redujo, hasta alcanzar un volumen mínimo con la dosis 12 mM (Gráfica 2). El efecto observado se debe probablemente a la inhibición en la producción de CH_4 , lo que provocó un aumento equimolar en la concentración de H_2 y CO_2 . El valor de gas encontrado se explica también por el uso que se le da a los reductores producidos (H_2), los cuales fueron dirigidos a la síntesis de propionato o β -alanina, que se estimula al máximo a 2.4 KPa o el equivalente de $1.48 \mu\text{mol de H}_2 \text{ mL}^{-1}$ (Schulman y Valentino, 1975) o como mínimo a valores cercanos a $0.267 \mu\text{mol de H}_2 \text{ mL}^{-1}$, como se puede observar en los tratamientos suplementados con concentraciones de 9 y 12 mM (Cuadro 1).

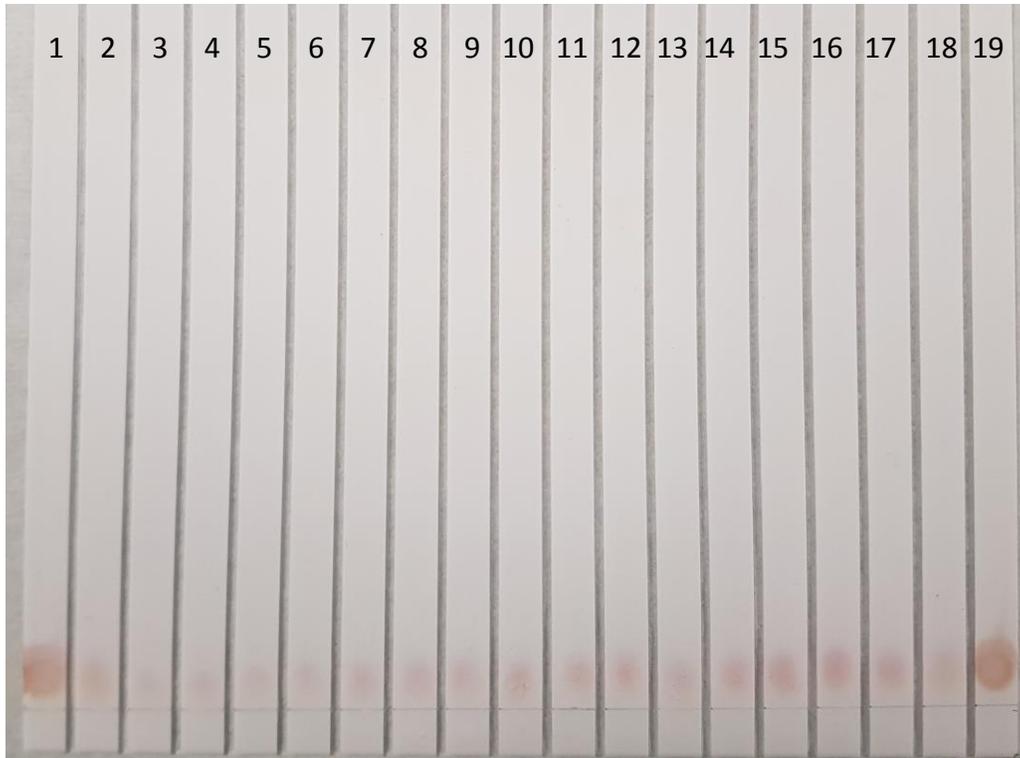
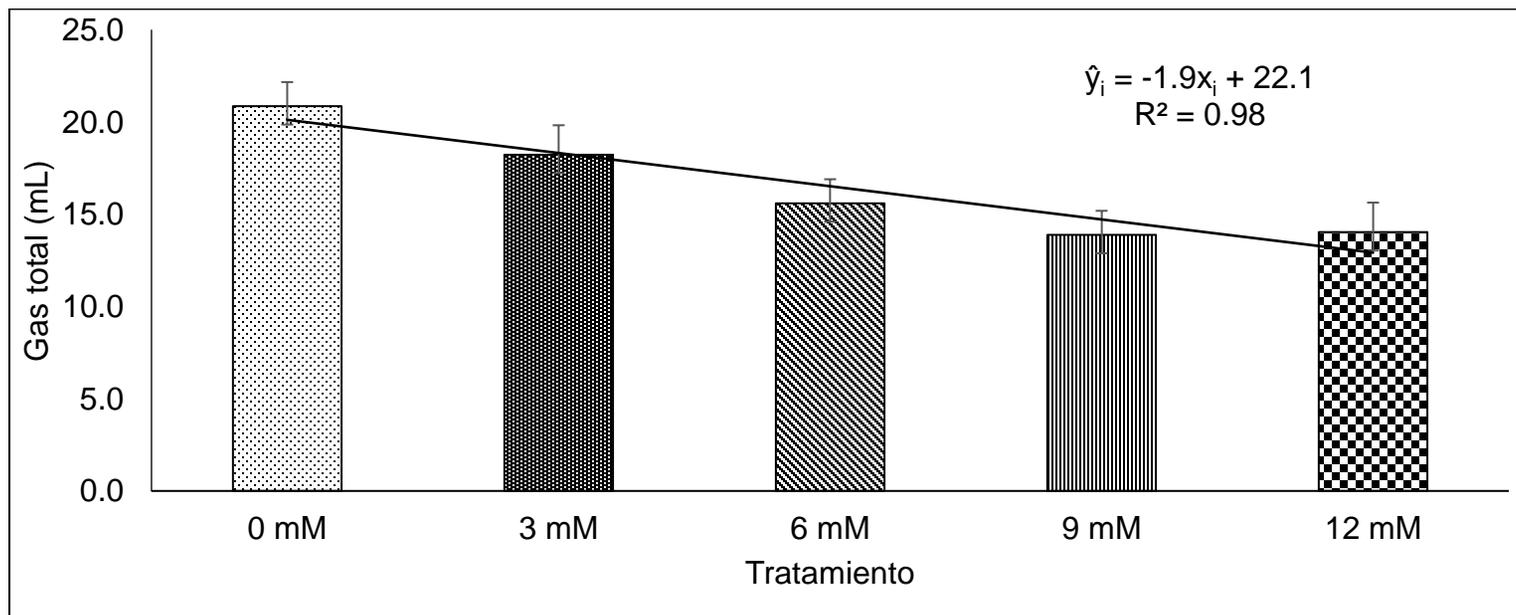


Figura 1. Cromatografía de capa fina de una mezcla de microorganismos ruminales después de 24 h de incubación bajo diferentes niveles de ácido 3 nitropropionico (3NPA). Significado de las líneas; 1 y 19: Estándar de β -alanina; 2 y 18 Control (0 mM) al inicio del experimento; 3-5, Control; 6-8 tratamiento 3 mM; 9-11 tratamiento 6 mM; 12-14 tratamiento 9 mM y 15-17 tratamiento 12 mM.

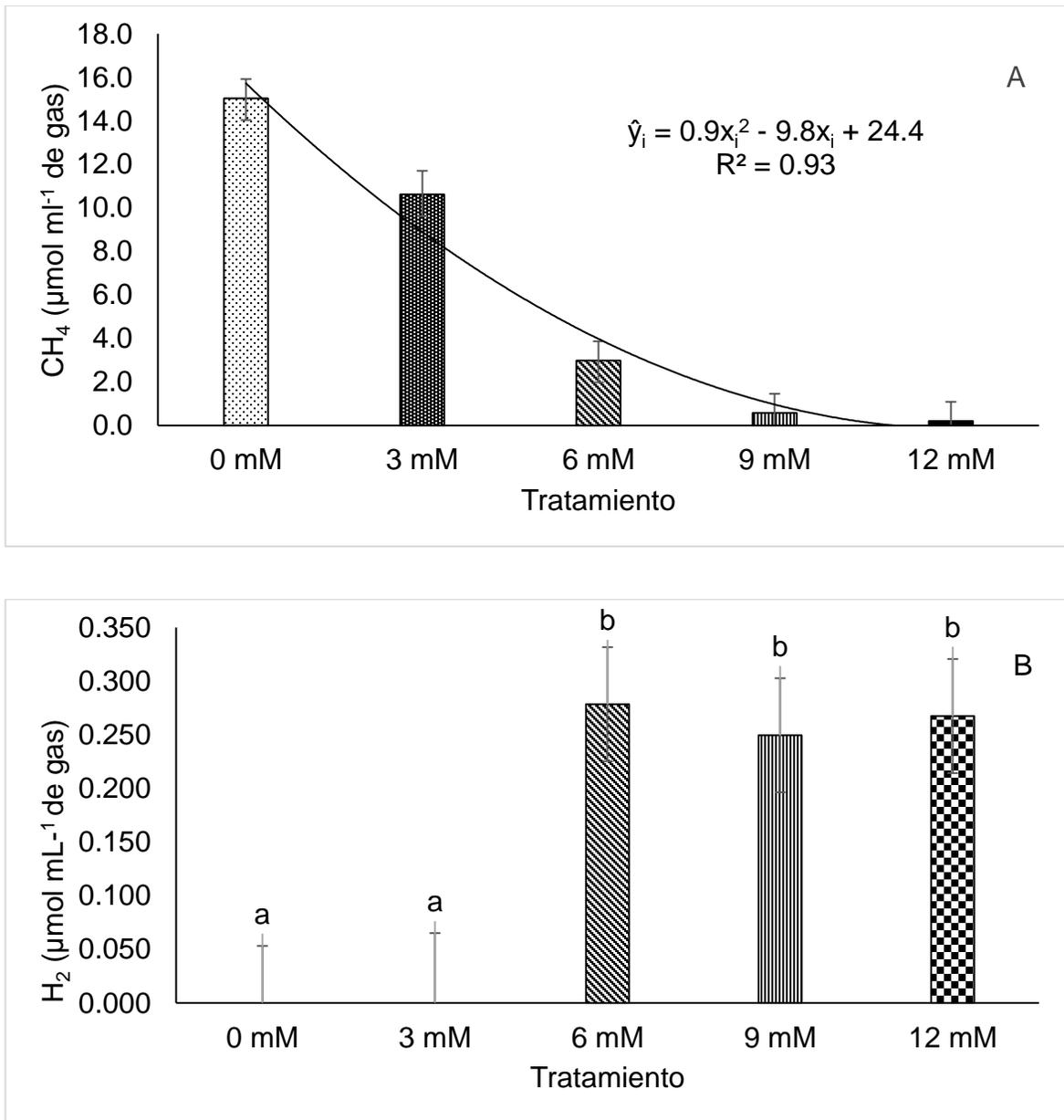


Gráfica 2. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) de gas total producido por una mezcla de microorganismos ruminales después de 24 h de incubación con diferentes niveles de tratamiento de ácido-3-nitro-1-propionico (3NPA). El análisis de tendencia con contrastes ortogonales polinomiales indica una tendencia lineal ($P < 0.01$) de reducción.

Producción de CH₄ e H₂

La concentración de CH₄ fue reducida de manera dosis dependiente, siguiendo una tendencia cuadrática ($P < 0.01$) como se puede observar en la (Gráfica 3A). La cantidad de CH₄ producida por los cultivos sin tratamiento fue de aproximadamente $15 \mu\text{mol mL}^{-1}$, lo que equivale a un total de $60.128 \mu\text{mol mL}^{-1}$ de reductor endógeno presente para llevar a cabo la metanogénesis. La suplementación con 3NPA redujo ($P < 0.05$) de manera contundente la producción de CH₄ hasta el nivel de $9 \mu\text{M}$, siendo marginal la reducción adicional con el nivel de $12 \mu\text{M}$ (en promedio 29, 80, 96 y 99 % para las dosis de 3, 6, 9 y 12 mM de 3NPA, respectivamente; Gráfica 3A). Los resultados muestran valores consistentes a los estudios realizados por Anderson *et al.* (2008), en donde la producción de CH₄ se vio reducida a valores cercanos al límite de detección ($0.10 \mu\text{mol mL}^{-1}$) cuando el medio fue suplementado con 12 mM, sin un reductor adicional. Por otra parte, al finalizar el período de incubación de 24 h se observó que la tasa a la cual se redujo la producción de CH₄ fue mayor ($P < 0.05$) al incrementar la concentración de 3NPA de 0 a 6 mM ($6.1 \mu\text{mol mL}^{-1}$) que cuando se incrementó de 6 a 12 mM ($1.4 \mu\text{mol mL}^{-1}$). Desde un punto de vista práctico, estos datos sugieren que la dosis de 3NPA más efectiva para ser usada está entre 6 y 9 mM, donde puede existir un balance entre toxicidad y potencial para reducir la producción de metano. Adicionalmente, estos resultados sugieren que la capacidad de 3NPA, que es un producto natural para reducir la producción de metano, es comparable a aquella observada para algunos productos sintéticos

como NE y 2NEOH y mayor a la de 2NPOH, en periodos de incubación de 22 a 24 h (Anderson *et al.* 2008).



Gráfica 3. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) para las concentraciones de metano (A) e hidrógeno (B) acumulado por una mezcla de microorganismos ruminales después de 24 h de incubación con diferentes niveles de tratamiento con ácido 3-nitro-1-propionico (3NPA). El análisis de tendencia con contrastes ortogonales polinomiales indica una tendencia cuadrática ($P < 0.05$) en las concentraciones de CH_4 .

La concentración de H₂ acumulado después de 24 h de incubación no fue diferente ($P > 0.05$) entre el tratamiento suplementado con 3 $\mu\text{M mL}^{-1}$ de 3NPA y el control. Sin embargo, la acumulación de H₂ se incrementó ($P < 0.05$) en el resto de los tratamientos (Gráfica 3B). Se ha estimado que el 18 % del H₂ utilizado para la producción de CH₄ proviene de la oxidación de formiato, llevada a cabo por la actividad de las enzimas formiato deshidrogenasa o formiato liasa, esta última más activa a bajas concentraciones de formiato (Asanuma *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2008; Gutiérrez Bañuelos *et al.*, 2008). Entonces, los electrones liberados en forma de H₂ son rápidamente oxidados por los metanógenos a través de la reducción del CO₂ a CH₄ (Asanuma *et al.*, 1998; Hungate *et al.*, 1970). Aunque la acumulación de H₂ en los medios de cultivo al final del periodo de incubación debería haber seguido una tendencia inversa a la concentración de CH₄, dicho efecto no ocurrió. Algunas de las razones por las que la acumulación de H₂ fue limitada, pudieran ser: a) la supuesta inhibición que es provocada por suplementación de 3NPA sobre la enzima formiato deshidrogenasa de bacterias metanógenas y no metanógenas y la actividad compensatoria de la enzima formiato liasa del sistema microbiano (Anderson *et al.*, 2008; Asanuma *et al.*, 1998), b) metabolización del 3NPA por reducción a β -alanina (Anderson *et al.*, 2008; Gutiérrez Bañuelos *et al.*, 2008), c) presencia de metabolitos reductores en el medio previos a la incubación y d) disposición de H₂ hacia la producción de ácido sulfhídrico, propionato y NH₃ (Morgavi *et al.*, 2010).

El mecanismo de inhibición de la enzima formiato deshidrogenasa propuesto, se ve explicado por estudios en los cuales las incubaciones

suplementadas con nitrocompuestos y formiato como único agente reductor, se limita casi completamente la producción de CH₄ (Anderson *et al.*, 2008). Así mismo, otro mecanismo de inhibición propuesto es el de la actividad liasa, la cual es más activa en condiciones de escasas de formiato (Asanuma *et al.*, 1998) e impide acumulaciones de H₂ debidas a la ausencia de la actividad metanogénica. Por lo que es probable que debido a una incompleta inhibición de la actividad formiato deshidrogenasa/ H₂ liasa, la concentración de H₂ en el tratamiento con 3 μM mL⁻¹ se haya observado bajo (Gráfica 3B).

La reducción de concentración de reductores como H₂, formiato y lactato provocados por la oxidación del suplemento adicionado es llevada a cabo por *D. detoxificans*, microorganismo anaerobio que ha demostrado poseer la capacidad de reducir 3NPA, NE, NEOH y 2NEOH (Anderson *et al.*, 2000). A pesar de que el microorganismo está presente en bajas cantidades, la exposición continua a forrajes que lo contienen de forma natural (Majak *et al.*, 1998) o a relativamente altas concentraciones (6 a 12 μM) de 3NPA, estimulan el crecimiento poblacional de esta bacteria. Aún se desconocen los requerimientos específicos para que se lleve a cabo la reducción de los compuestos utilizables por *D. detoxificans*; sin embargo, de acuerdo a lo observado, es probable que sean dependientes al enriquecimiento en el medio de esta bacteria debido a la dosis de suplemento añadido.

La presencia de metabolitos reducidos en el medio, como la adición de formiato, lactato, H₂ adicional o cualquier otro aceptor alternativo de electrones desempeña un papel importante en la concentración final de H₂ y en la

producción de CH₄, siempre y cuando el H₂ se encuentre disponible y en concentraciones no inhibitorias (Sparling y Daniels, 1990). La concentración normal de H₂ presente en el medio ruminal es de aproximadamente 1 μM (0.1 kPa). Se ha encontrado que en condiciones de laboratorio valores cercanos a 0.62 μmol de H₂ mL⁻¹ (1 kPa) limitan la transferencia de electrones entre especies (Hungate, 1975; Van Nevel and Demeyer, 1996). Actualmente se desconoce la actividad hidrogenasa del 3NPA sobre microorganismos específicos del ecosistema ruminal; sin embargo, se sabe que 2NEOH posee la capacidad de inhibir microorganismos metanógenos a través de la oxidación de los portadores de electrones compuestos por ferredoxina o por la inhibición de portadores sin ferredoxina (Angermaier y Simon, 1983). En el presente estudio, se realizaron incubaciones en las que la concentración de H₂, previo a la incubación eran nulas; sin embargo, al limitar la actividad metanogénica éstas alcanzaron una concentración de entre 0.25 a 0.28 ± 0.05 μM (Figura 3B); por lo que es poco probable que las concentraciones de H₂ llegaran a causar una inhibición de la actividad hidrogenasa.

Concentración de Ácidos Grasos Volátiles y Amonio.

La producción de AGVs al final del periodo de incubación de 24 h se redujo (P < 0.01) en todos los tratamientos. Las reducciones observadas fueron de 37 y 20.3 % para los tratamientos con 3 y 12 μM mL⁻¹ de 3NPA, respectivamente, comparados con el control. La misma tendencia se observó para acetato como ácido graso individual. Así mismo, la concentración de propionato no fue afectada por los tratamientos, excepto en aquellos cultivos suplementados con 3 μM mL⁻¹

de 3NPA donde la concentración de propionato disminuyó. Estos hallazgos son consistentes con previos reportes que describen el efecto de 3NPA sobre la producción de AGV's en el rumen (Schulman y Valentino, 1975). Sin embargo, son contrarios al efecto que normalmente se ha observado con la mayoría de los inhibidores de la metanogénesis, en donde la producción de propionato se ha incrementado como resultado de un redireccionamiento de los electrones comúnmente usados para la reducción de CO₂ a CH₄. Se ha reportado que el flujo de electrones hacia la síntesis de propionato ocurre a una presión parcial de hidrogeno ≥ 2.4 kPa o el equivalente 0.267 a 1.48 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mL}^{-1}$ (Schulman y Valentino, 1975). Por otra parte, el butirato se incrementó en todos los tratamientos, excepto en aquellos suplementados con 3 $\mu\text{M mL}^{-1}$, comparados con el control (Cuadro 1).

Los valores aquí presentados, proveen evidencia del efecto inhibitorio de la fermentación ruminal, causado por el 3NPA. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Beauchemin y McGinn, 2006; y Ungerfeld *et al.*, 2007) cuando diversos inhibidores de la metanogenesis han sido usados. Adicionalmente, estos autores observaron una reducción en la digestibilidad de la materia seca. Incluso, la reducción en la digestibilidad de la materia seca observada por estos autores conduce a la reducción en la producción de acetato. Sin embargo, el efecto de los compuestos anti metanogénicos en la síntesis de AGV's depende de diversos factores, tales como la adición de formiato o hidrógeno. En este sentido, la acumulación de formiato e hidrógeno pueden afectar la síntesis de AGV's (Anderson *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2006).

La relación acetato/propionato entre tratamientos se vio reducida al aumentar la concentración de 3NPA ($P < 0.05$), lo que posiblemente se deba al efecto provocado tras la suplementación y la acumulación posterior de H_2 , lo cual propicia la acumulación de ácidos grasos (particularmente propionato), haciendo uso de los reductores producidos para la generación de productos de fermentación (Van Nevel y Demeyer, 1996). La producción de propionato normalmente se incrementa debido a la suplementación de inhibidores de la producción de metano, como 9,10-antraquinona (García-López *et al.*, 1996; Kung *et al.* 2003) y malato de dialilo (Lila *et al.*, 2004); con disminuciones en la concentración molar de acetato e incrementos leves en la cantidad AGV totales.

La concentración de amonio (NH_3) producida al final del periodo de incubación no presentó diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos; sin embargo, la cantidad promedio de NH_3 en cada tratamiento se incrementó al aumentar la concentración de 3NPA (Cuadro 1).

Es posible que el efecto encontrado en cada uno de los tubos se deba a la adición del suplemento y la estimulación de bacterias como *D. detoxificans*, las cuales son capaces de producir NH_3 a partir de NO_3 (Anderson *et al.*, 2005). En estudios en donde se evaluó la producción de NH_3 al inhibir la producción de CH_4 se encontró una equivalencia estequiométrica entre el CH_4 inhibido y la cantidad de NO_3 reducida a NH_3 (Anderson *et al.*, 1998). Otro de los factores que incrementan la producción de NH_3 es la disminución en la relación A:P y la metabolización de ácidos grasos de cadena ramificada (Lana *et al.*, 1998; Gutierrez-Bañuelos *et al.*, 2008), lo que concuerda con algunos de los resultados

observados en el Cuadro 1. La determinación del efecto en la producción de NH_3 al utilizar otros compuestos nitrogenados como 2NPOH, NE y 2NEOH han reportado un incremento en la producción de NH_3 (Anderson *et al.*, 2003), lo que representa una tendencia similar a la encontrada en este estudio.

Estudios previos han reportado bajos niveles de producción de NH_3 en los tubos con una fase gaseosa conteniendo CO_2 . Por otra parte, se han reportado incrementos en la producción de NH_3 al incubar tubos en condiciones similares a las de este experimento, pero conteniendo una fase gaseosa de H_2 (80%) o formiato excedente en la fase líquida (Anderson *et al.*, 2008). La adición de estos elementos implica cambios importantes en el pH inicial en el medio y un posterior incremento en la producción de NH_3 , efecto observado en dietas con alto contenido de forraje (Lana *et al.*, 1998). Cabe mencionar que el incremento en la producción de H_2 es limitada en algunas ocasiones por la producción de NH_3 (Hino y Rusell, 1985); sin embargo, se desconocen los factores involucrados en la producción o reducción de este producto.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La suplementación de 3NPA a la fermentación con una mezcla de microorganismos ruminales *in vitro* reduce dramáticamente la producción de metano en condiciones *in vitro* y su efecto depende de la dosis. Sin embargo, el efecto se extiende a la producción de ácidos grasos volátiles. El mecanismo de acción de este inhibidor de metano sigue siendo desconocido. Se sospecha que podría deberse, al menos parcialmente, a una reorientación de los reductores necesarios para la reducción del dióxido de carbono a metano, como es el hidrógeno, que podría utilizarse para disminuir la reducción del nitrocompuesto a β -alanina, como se observó en este experimento. En la actualidad, la principal limitación para el uso de 3NPA como suplemento alimenticio es el alto costo de su aplicación. Por lo tanto, encontrar fuentes alternativas y de menor costo es un gran desafío para los investigadores. Además, es necesario un conocimiento más profundo de los efectos de la suplementación con nitrocompuestos en la dinámica de la población microbiana ruminal para comprender mejor su efecto sobre la función ruminal, dada su importancia para el huésped. Por último, se necesitan más investigaciones para determinar el efecto sobre la productividad animal y conocer la dosis óptima y segura de uso, ya que el metabolismo completo del nitrocompuesto garantizará un producto alimenticio animal libre de este compuesto y un mejor rendimiento económico del producto alimenticio.

LITERATURA CITADA

- Anderson, R. C., Callaway, T. R., Van Kessel, J. A. S., Jung, Y. S., Edrington, T. S. y Nisbet, D. J. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresour. Technol.* 90: 59-63.
- Anderson, R. C., Carstens, G. E., Miller, R. K., Callaway, T. R., Schultz, C. L., Edrington, T. S., Harvey, R. B. y Nisbet, D. J. 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *Bioresour. Technol.* 97: 2421-6.
- Anderson, R. C., Krueger, N. A, Stanton, T. B., Callaway, T. R., Edrington, T. S., Harvey, R. B., Jung, Y. S. y Nisbet, D. J. 2008. Effects of select nitrocompounds on in vitro ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *Bioresour. Technol.* 99: 8655-61.
- Anderson, R. C., Majak, W., Rasmussen, M. A, Callaway, T. R., Beier, R. C., Nisbet, D. J., Allison, M. J. 2005. Toxicity and metabolism of the conjugates of 3-nitropropanol and 3-nitropropionic acid in forages poisonous to livestock. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2344-50.
- Anderson, R. C., Rasmussen, M. A. y Allison, M. J. 1993. Metabolism of the plant toxins nitropropionic acid and nitropropanol by ruminal microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3056-61.
- Anderson, R. C., Rasmussen, M. A., Jensen, N. S. y Allison, M. J., 2000. *Denitrobacterium detoxificans* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium that respire on nitrocompounds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 633-38.
- Angermaier, L. y Simon, H. 1983. On the reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds by Clostridia, the role of ferredoxin and its stabilization. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364: 961-75
- Beauchemin, K. A. y McGinn. S. M. 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84: 1489-96.
- Bozic, A. K., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Ricke, S. C., Callaway, T.R., Yokoyama, M. T., Wang, J. K. y Nisbet, D.J. 2009. Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation *in vitro*. *Bioresour. Technol.* 100: 4017-25.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M. D., y Kamel, C. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 88: 4393-04.
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmüller, A. y Hess, H. D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 961-70.
- Chalupa, W. 1977. Manipulating rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* 46(3): 585-599.

- Demeyer, D. I. y De Graeve, K. 1991. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *J. Anim. Physiol Anim. Nutr.* 22: 50-61.
- Demeyer, D. I. 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, p. 217-237.
- Evans, J. D., y Martin, S. A. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.*, 41:336-40.
- Galyean, M. y May, T. 1989. Laboratory procedure in animal nutrition research. *Dep. Anim. Life Sci. Texas Tech Univ.*
- García-Lopez, P. M., Kung, L. Jr. y Odom, J.M. I. 1996. In vitro inhibition of microbial methane production by 9,10- anthraquinone. *J. Anim. Sci.*, 74: 2276-84.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C. y Eckard, R. J., 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89: 241-251.
- Gustafson, R.H., Bowen, R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J Appl. Microbiol.* 83: 531-41.
- Gutierrez-Bañuelos, H., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Slay, L. J., Ramlachan, N., Horrocks, S. M., Callaway, T. R., Edrington, T. S., Nisbet, D. J. 2007. Zoonotic bacterial populations, gut fermentation characteristics and methane production in feedlot steers during oral nitroethane treatment and after the feeding of an experimental chlorate product. *Anaerobe* 13: 21–31.
- Gutierrez-Bañuelos, H., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Tedeschi, L. O., Pinchak, W. E., Cabrera-Diaz, E., Krueger, N. A., Callaway, T. R. y Nisbet, D. J. 2008. Effects of nitroethane and monensin on ruminal fluid fermentation characteristics and nitrocompound-metabolizing bacterial populations. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4650-58.
- Harper, R. J., Beck, A. C., Ritson, P., Hill, M. J., Mitchell, C. D., Barrett, D. J., Smettem, K. R. J. y Mann, S. S. 2007. The potential of greenhouse sinks to underwrite improved land management. *Ecol. Eng.*, 29: 329-41
- Hegarty, R. S., Goopy, J. P., Herd, R. M. y McCorkell, B. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *J. Anim. Sci.* 85:1479-86.
- Hess, H. D., Beuret, R. A., Lotscher, M., Hindrichsen, I. K., Machmuller, A., Carulla, J. E., Lascano, C. E., Kreuzer, M. 2004. Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Anim. Sci.* 79: 177-189.
- Hess, H. D., Monsalve, L. M., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Díaz, T. E., Kreuzer, M. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus*

- saponaria* fruits: Effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. Aust. J. Agric. Res. 54: 703-713.
- Hino, T. y Russell, J. B. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1368–74.
- Holtshausen, L. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. J. Dairy Sci. 92:2809-21.
- Iannotti, E. L., Kafkewitz, D., Wolin, M. J., y Bryant, M. P. 1973. Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. J. Bacteriol., 114: 1231-1240.
- IPCC (2007). Summary for Policymakers. In Solomon, S. D., Qin, M., Manning, Z., Chen, M., Marquis, K. B, Averyt, M. T., & Miller, H. L. (Eds.), Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Johnson, K. A. y Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim Sci, 73: 2483–92.
- Julliard V. 1992. Microbiology of the equine hindgut. Proceedings of the 1st European Conference on the Nutrition of Horse, Hanover. pp. 42–47.
- Kamra, D. N., Patra, A. K., Chatterjee, P. N., Kumar, R., Agarwal, N. y Chaudhary, L. C. 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: A brief overview. Aust. J. Exp. Agric. 48: 175–178.
- Lana, R. P., J. B. Russell y M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. J. Anim. Sci. 76:2190-96.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Tatsuoka, N., Kanda, S., Kurokawa, Y., y Itabashi, H. 2004. Effect of cyclodextrin diallyl maleate on methane production, ruminal fermentation and microbes *in vitro* and *in vivo*. Anim. Sci. J., 75: 15-22
- Majak, W. 1992. Further enhancement of 3-nitropropanol detoxification by ruminal bacteria in cattle. Can. J. Anim. Sci. 72, 863-70.
- Majak, W., Hunter, C. y Stroesser, L. 1998. Tolerance in cattle to timber milkvetch (*Astragalus miser* var. *serotinus*) due to changes in rumen microbial populations. In Toxic Plants and Other Natural Toxicants; Garland, T., Barr, A.C., Eds.; CAB International, New York, pp. 239-42.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K. y Mathison, G. W. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. Can. J. Anim. Sci. 76: 231-43.

- McCaughey, W. P., Wittenberg, K. y Corrigan, D. 1997. Methane production by steers on pasture. *Can. J. Anim. Sci.* 77: 519–24.
- McCraib, G. J., Berger, K. T., Magner, T., May, C., y Hunter R. A. 1997. Inhibiting methane production in Brahman cattle by dietary supplementation with a novel compound and the effects on growth. *Aust. J. Agric. Res.* 48: 323-329.
- Mcintosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Newbold, C. J. y Beever, D. A. 2003. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5011-14.
- Mohammed, N., N. Ajisaka, Z. Lila, K. Hara, K. Mikuni, K. Hara, S. Kanda, y 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. Jouany, and C. J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231-253.
- Nelson, G. C., Rosegrant, M. W., Koo, J., Robertson, R., Sulser, T., Zhu, T., y Lee, D. 2009. Climate Change: Impact on Agriculture and Costs of Adaptation. Food Policy Report, International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington DC, USA, pp 30.
- Newbold, C. J., Hassan, S. M. E., Wang, J., Ortega, M. E. y Wallace, R. J., 1997. Influence of foliage from African multipurpose tree on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78: 237-249.
- Ohene-Adjei, S., Chaves, A. V., McAllister, T. A., Benchaar, C., Teather, R. M. y Forster, R. J. 2008. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Micr. Ecol.* 56: 234-242.
- Olivier, J. G. J., Van Aardenne, J. A., Dentener, F., Ganzeveld, L. y Peters, J. A. H. W. 2005. Recent trends in global greenhouse gas emissions: Regional trends and spatial distribution of key sources. In A. van Amstel (Ed.) *Non-CO₂ greenhouse gases*. Rotterdam: Millipress. pp. 325.-30
- Patra, A. K., Kamra, D. N., Bhar, R., Kumar, R., Chaturvedi, V. B., y Agarwal, N. 2010b. Effect of Terminalia chebula and Allium sativum on nutrient utilization and methane production in sheep. *J. Anim. Physiol. An. N.*, 95:187– 191.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., y Agarwal, N. 2008. Effect of leaf extracts on fermentation of feds and methanogenesis with rumen liquor of buffalo. *Indian J. Anim. Sci.* 78: 91–96.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., y Agarwal, N. 2010a. 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 Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198–22.

- Patra, A.K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1929–52.
- Patra, A.K., Kamra, D.N. y Agarwal, N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128: 276–91.
- Paynter, M. J. B, y Hungate, R. E. 1968. Characterization of *Methanobacterium mobilis* sp.nov., isolated from the bovine rumen. *J. Bacteriol.*95: 1943-51
- Russell J.B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*, *J. Dairy Sci.* 81: 3222-30.
- Schulman, M. D. y Valentino, D. 1975. Factors influencing rumen fermentation: effect of hydrogen on formation of propionate. *J. Dairy Sci.* 59: 1444-51.
- Sparling, R. y Daniels, L. 1987, 'The Specificity of Growth Inhibition of Methanogenic Bacteria by Bromoethanesulfonate', *Can. J. Microbiol.* 33: 1132-36
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., y Haan de, C., 2006. *Livestock's long shadow*. Rome, Italy. p. 408.
- Tukey, J. W. 1953. The problem of multiple comparison. Notas no publicadas, Princeton Univ., Princeton, NJ.
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R. y Burnett, R. 2007. Increases in microbial nitrogen production and efficiency *in vitro* with three inhibitors of ruminal methanogenesis. *Can. J. Microbiol.* 53: 496-03.
- Van Kessel J. S. y Russell J. B. 1969. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 205–10.
- Van Nevel, C.J. y Demeyer, D. I. 1996. Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42: 73–97.
- Wilson B.T. 1971. Miscellaneous Penicillium toxins. In: Ciegler A, Kadis S, Ajl SJ, eds. *Microbial Toxins, Vol. 6: Fungal Toxins*. Academic Press, New York, E. U. A. pp.460-17.
- Williams, M. C., y R. C. Barneby. 1977. The occurrence of nitro-toxins in North American *Astragalus* (Fabaceae). *Brittonia.* 29:310-26.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S. and Becker, K. 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121: 159-74.
- Wolin M.J. 1979. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems, in: Alexander M. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, Plenum, New York & London, Vol. 3, pp. 49–77.

Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43(10): 1452-1459.

Zehnder, A. J. y Brock, T. D. 1979. Methane formation and methane oxidation by Methane Formation and Methane Oxidation by Methanogenic Bacteria. *J. Bacteriol.* 137: 420-32.