



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MENTA (*MENTHA PIPERITA*), CLAVO (*SYZYGIIUM AROMATICUM*), EUCALIPTO (*EUCALYPTUS SPP*) Y MONENSINA SÓDICA EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

**CESAR DÍAZ GALVÁN**

COMITÉ DE TUTORES:

DR. PEDRO ABEL HERNÁNDEZ GARCÍA

DR. ENRIQUE ESPINOSA AYALA

DR. JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ GARCÍA

Amecameca de Juárez, Estado de México, Noviembre 2017

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado a mis padres, gracias por todo el apoyo y amor que siempre me han brindado en todo momento, así como también a mis hermanos, quienes siempre han estado conmigo alentándome a seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por la oportunidad brindada de formar parte del Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Al Dr. Pedro Abel Hernández García y al Dr. Enrique Espinosa Ayala por el apoyo brindado, por sus consejos y por la confianza depositada a lo largo de mi formación académica.

A mis compañeros de posgrado Lucero, Citlali, Minerva, Pablo y Salvador por todo el apoyo y por sus consejos brindados.

A los compañeros Hilario y Luis de la Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, por el apoyo brindado.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de 1, 2 y 3 % de eucalipto (*Eucalyptus spp*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y menta (*Mentha piperita*), así como 0.20 ppm de monensina sódica en una dieta para ovinos en finalización sobre la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*. Se registraron las lecturas de presión y volumen de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h, evaluando volumen máximo de gas, tasa de producción de gas, fase lag, degradabilidad de la materia seca, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y ácidos grasos volátiles (AGV). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, comparando las medias con una prueba de Tukey (P<0.05), además de realizar un arreglo factorial 3 x 4, determinando las interacciones entre las tres plantas y los cuatro niveles. Las dietas con monensina sódica y eucalipto presentaron una disminución en el volumen máximo de gas (P=0.0001), así como menor producción de CH<sub>4</sub> (P=0.01) y CO<sub>2</sub> (P=0.004); la producción de AGV mostró diferencias (P=0.01) en ácido acético con el 1 % de eucalipto, además de menor producción de ácido butírico (P=0.01), mientras que con el 2 % aumentó (P=0.01) el ácido propiónico y se obtuvo una menor relación acético:propiónico. Al emplear eucalipto sin monensina, se presentó una disminución en tasa de producción de gas (P=0.0008), así como menor producción de gas (P=0.0001) y degradabilidad (P=0.0007), por otro lado al emplear menta la fase lag fue menor (P=0.0001) y se observó mayor reducción en CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (P=0.0001), finalmente la adición del clavo redujo la tasa de producción de gas (P=0.0004). Por lo cual se concluye que el uso de eucalipto al 3 % disminuye el volumen máximo de gas, tasa de producción de gas así como producción de CH<sub>4</sub>, además de incrementar la producción de ácido propiónico.

**Palabras clave:** Productos herbales, gases de efecto invernadero; ionóforo; producción de gas *in vitro*.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of inclusion of 1, 2 and 3% of eucalyptus (*Eucalyptus spp*), cloves (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha piperita*), as well as 0.20 ppm of monensin sodium in a diet for sheep in ending, on ruminal fermentation and methane production *in vitro*. Gas pressure and volume readings were recorded at 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h, evaluating maximum gas volume, gas production rate, lag phase, degradability of the material dry, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and volatile fatty acids (VFA). The data were analyzed using a completely randomized design, comparing the means with a Tukey test (P <0.05), in addition to making a 3 x 4 factorial arrangement, determining the interactions between the three plants and the four levels. The diets with monensin sodium and eucalyptus showed a decrease in the maximum gas volume (P = 0.0001), as well as lower production of CH<sub>4</sub> (P = 0.01) and CO<sub>2</sub> (P = 0.004); the production of VFA showed differences (P = 0.01) in acetic acid with 1% of eucalyptus, in addition to lower production of butyric acid (P = 0.01), while 2% increased (P = 0.01) propionic acid and a lower acetic: propionic ratio. When using eucalyptus without monensin, a decrease in gas production rate (P = 0.0008) was observed, as well as lower gas production (P = 0.0001) and degradability (P = 0.0007). On the other hand, when using lag phase mint was lower (P = 0.0001) and a greater reduction in CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> (P = 0.0001) was observed, finally the addition of the nail reduced the gas production rate (P = 0.0004). It is concluded that the use of 3% eucalyptus showed a decrease in maximum gas volume, gas production rate as well as CH<sub>4</sub> production, in addition to increasing propionic acid production.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
2. ANTECEDENTES .....	- 3 -
2.1 Cambio climático en México .....	- 3 -
2.2 Gases de efecto invernadero.....	- 3 -
2.3 Fermentación y digestión ruminal .....	- 5 -
2.4 Microorganismos ruminales .....	- 6 -
2.5 Bacterias metanogénicas .....	- 7 -
2.6 Metanogénesis.....	- 9 -
2.7 Opciones de mitigación en la producción de metano .....	- 10 -
2.7.1 Efecto de la alimentación sobre la producción de metano .....	- 12 -
2.7.2 Composición de la dieta .....	- 12 -
2.8 Uso de aditivos para reducir la producción de metano entérico .....	- 13 -
2.8.1 Ionóforos .....	- 13 -
2.8.2 Monensina sódica.....	- 13 -
2.8.3 La monensina en la alimentación de rumiantes .....	- 14 -
2.9 Lípidos y aceites .....	- 14 -
2.10 Aceites esenciales .....	- 15 -
2.11 Ácidos grasos .....	- 16 -
3. JUSTIFICACIÓN.....	- 17 -
4. HIPÓTESIS.....	- 18 -
5. OBJETIVOS .....	- 19 -
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	- 20 -
6.1. Dietas experimentales.....	- 20 -
6.2. Producción de gas <i>in vitro</i> .....	- 20 -
6.3. Determinación de ácidos grasos volátiles .....	- 22 -

6.4.	Análisis estadístico .....	- 22 -
7.	RESULTADOS.....	- 23 -
8.	CONCLUSIONES GENERALES .....	53
9.	LITERATURA CITADA .....	54

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Principales países generadores de metano (Tg) .....	- 4 -
Figura 2. Fuentes de emisiones de metano globales.....	- 5 -
Cuadro 1. Bacterias metanogénicas .....	- 8 -
Figura 3. Rutas empleadas en la formación de metano ruminal .....	- 10 -
Figura 4. Alternativas empleadas en la disminución de metano entérico .....	- 11 -
Cuadro 2. Composición de la dieta experimental. ....	- 21 -

## 1. INTRODUCCIÓN

El metano (CH<sub>4</sub>) es un gas de efecto invernadero, el cual presenta un potencial de calentamiento 23 veces superior al CO<sub>2</sub> (Peters *et al.*, 2012), contribuyendo significativamente al calentamiento del planeta (Hartung y Monteny, 2000; Lassey, 2007), es derivado principalmente por la digestión de carbohidratos estructurales bajo condiciones anaerobias en el interior del rumen produciéndose algunos otros compuestos finales de la fermentación tales como ácidos grasos volátiles (AGV; acetato, propionato, butirato) formato, etanol, lactato, succinato y ácidos grasos ramificados (Janssen, 2010; Banik *et al.*, 2013), de estos los AGV son la principal fuente de energía para el animal, generándose amonio, hidrógenos y dióxido de carbono, estos dos últimos subproductos son reducidos y convertidos en metano por un grupo de bacterias denominadas *Arqueas* metanogénicas, la generación de este gas es un proceso en el que se pierde aproximadamente del 2 al 12% de la energía bruta que consumen los rumiantes el cual es liberado a la atmósfera a través del eructo principalmente (Kamra *et al.*, 2012; Inamdar *et al.*, 2015).

Existen diferentes estrategias las cuales han sido empleadas con el fin de aminorar éstas emisiones de metano, tal es el caso de la inmunización, control biológico, probióticos, eliminación de protozoarios del rumen, manipulación en la dieta de los animales (Patra, 2012), así como el uso de extractos de plantas y aditivos alimenticios, los cuales han mostrado efecto antimetanogénico alterando el patrón de fermentación, inhibiendo directamente a bacterias productoras de metano (Śliwiński *et al.*, 2002; Patra *et al.*, 2006; Goel *et al.*, 2008).

Dentro de estas alternativas se destaca el uso de ionóforos, los cuales han sido utilizados como aditivos en la alimentación de rumiantes incrementando la eficiencia en la conversión alimenticia. La monensina sódica presenta efectos sobre la fermentación ruminal, se ha demostrado su eficacia contra bacterias gram positivas ejerciendo limitada o nula actividad contra bacterias gram negativas, aumentando las concentraciones de ácido propiónico y disminuyendo el acetato ruminal indispensable para la formación del metano (Van Vugt *et al.*, 2005; Odongo *et al.*, 2007), sin embargo el uso de agentes antimicrobianos como aditivos alimenticios puede contribuir a la generación de resistencia bacteriana en animales y

humanos (Chesson, 2006), por lo que actualmente ha crecido el interés de utilizar extractos de plantas como alternativas en la alimentación de rumiantes.

Investigaciones realizadas en las cuales han empleado metabolitos secundarios de plantas como saponinas, taninos y aceites esenciales (Wallace, 2004; Benchaar *et al.*, 2008; Rira *et al.*, 2015) han mostrado el potencial que presentan para promover la fermentación microbiana del rumen, disminuyendo las emisiones de metano, exhibiendo actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos como bacterias, protozoarios y hongos atribuyendo su efecto al número de terpenoides y compuestos fenólicos (Chao *et al.*, 2000). Es por este motivo que al disminuir estas emisiones de metano entérico se incrementa la productividad animal disminuyendo las pérdidas energéticas y el impacto ambiental (Niggli *et al.*, 2009).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cambio climático en México**

México es uno de los países más comprometidos con los esfuerzos globales de mitigación del cambio climático, es por ello que el país firmó la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC) en 1992 y el Protocolo de Kioto en 1997, y ha diseñado una Estrategia Nacional de Cambio Climático (ENCC) en 2007. Adicionalmente, se ha conformado una Comisión Intersecretarial de Cambio Climático (CICC) con el objeto de coordinar las acciones de la administración pública federal relativas a formular e instrumentar la política nacional para prevenir, mitigar y adaptarse al cambio climático (Banco Mundial, 2010). La CICC es responsable de trazar la ENCC e incluirla en el plan nacional de desarrollo 2007-2012, cuyos objetivos se traducen en: a) reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), y b) impulsar medidas de adaptación a los efectos del cambio climático (SAGARPA, 2010).

### **2.2 Gases de efecto invernadero**

Los GEI más importantes son el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), los cuales tienen un potencial de calentamiento, de 1, 23 y 196 veces superior al CO<sub>2</sub> respectivamente (Solomon *et al.*, 2007). El CO<sub>2</sub> es emitido mayoritariamente por la quema de combustibles fósiles, mientras que el metano es originado principalmente por fermentación entérica en rumiantes, mientras que el N<sub>2</sub>O es derivado por el uso de fertilizantes nitrogenados en la producción agropecuaria (Cabrera *et al.*, 2010). El metano es un potente gas de efecto invernadero más importante debido a los cambios atmosféricos que genera ocasionando el calentamiento global, las emisiones provenientes de la agricultura representan alrededor del 50 % del total del metano de fuentes antropogénicas (Scheehle y Kruger, 2006), es un gas incoloro e inodoro, se produce predominantemente en el rumen (87%) y en menor medida en el intestino grueso (13%) (Murray *et al.*, 1976; Torrent y Johnson 1994), a pesar de poseer un mayor poder de calentamiento respecto al CO<sub>2</sub>, su tiempo de vida media en la atmósfera es de 10 años (Moss *et al.*, 2000).

Los rumiantes son responsables de alrededor del 23 % de la producción de metano global, este gas es emitido a la atmósfera mediante la eructación y la cantidad que es liberada depende del volumen de alimento consumido y de la composición de la dieta, originándose a partir de la fermentación de carbohidratos de la dieta en el rumen (McGinn *et al.*, 2008). Dentro de los principales países que generan mayores cantidades de metano son: China, Brasil, India, Estados Unidos, Australia, Pakistán, Argentina, Rusia, México y Etiopía (Figura 1).

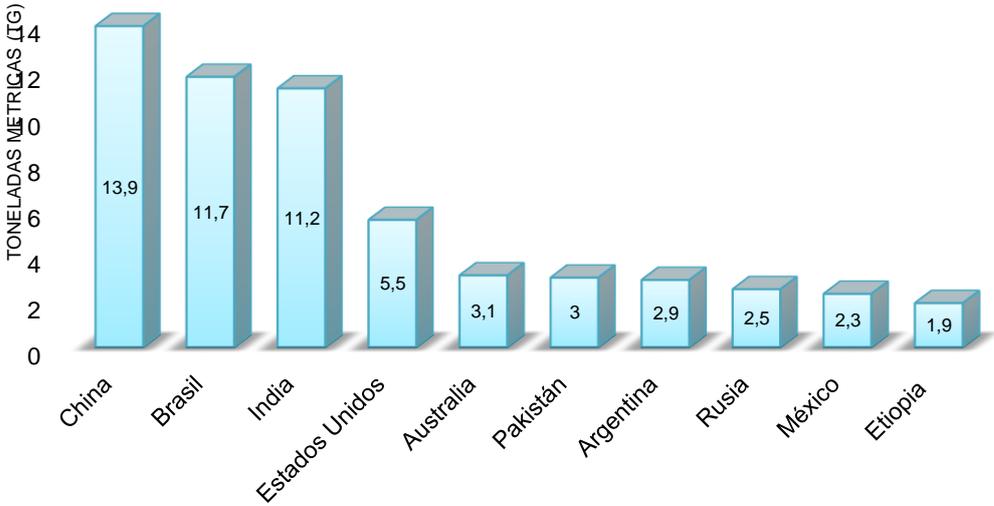


Figura 1. Principales países generadores de metano (Tg) (US EPA, 2006).

La producción de 1 L de metano equivale a 39.5 kJ de energía del alimento (IPCC, 2001), reportándose pérdidas de energía en forma de metano en la dieta de los rumiantes del 2 al 12 %, en ganado lechero la pérdida de energía varía de 5.5 - 9.0 y de 3.5 - 6.5 % en ganado de engorda, lo cual depende de la calidad, consumo de alimento, composición de la dieta y el procesamiento del alimento. Los rumiantes domésticos como bovinos, ovinos y cabras producen hasta 86 millones de toneladas métricas (Tg) de metano al año, aproximadamente 18.9 Tg corresponden a ganado lechero, 55.9 Tg a bovinos productores de carne y 9.5 Tg a ovinos y caprinos (McMichael *et al.*, 2007). La contribución de metano mundial al año de búfalos es de 6.2 - 8.1 Tg, 0.9 - 1.1 gT en camellos, y la producción de metano del ciego de cerdos y caballos es aproximadamente de 0.9 - 1.0 gT y 1.7 Tg respectivamente (Johnson y Ward 1996).

En México, el sector agropecuario es una fuente importante de emisiones de GEI, en el inventario nacional de 1990-2002, se observa que en el 2002 el 8.3% de las emisiones totales (46,146 Gg CO<sub>2</sub> eq) fueron producto del sector agropecuario, mientras que para el 2006 las emisiones de este sector disminuyeron en un 6.4% (45,552 Gg CO<sub>2</sub> eq), representado por el 81.6% fermentación entérica, 15.3% a suelos agrícolas, 2.6% a manejo del estiércol y el resto a cultivo de arroz y quema de residuos (CICC, 2007) (Figura 2).

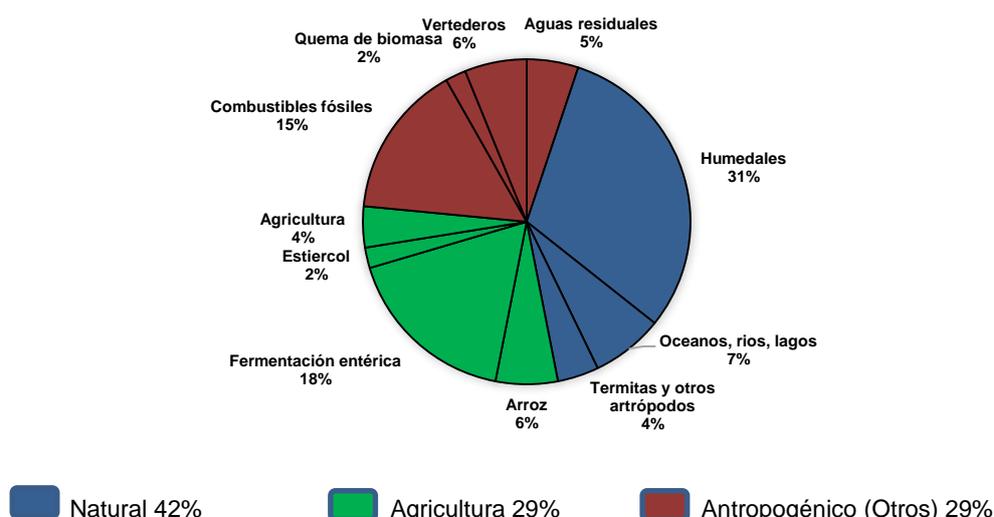


Figura 2. Fuentes de emisiones de metano globales

(EPA, 2010; 2011).

### 2.3 Fermentación y digestión ruminal

La alimentación del rumiante está basada principalmente en alimentos fibrosos como los forrajes y alimentos concentrados (Church, 1974). En ovinos, el volumen ruminal es de 5.3 L equivalente al 13 % de su peso corporal, mientras que en bovinos el volumen es de 48 L o 15 – 21 % del peso corporal (Owens *et al.*, 1993).

El proceso de fermentación es llevado a cabo por los microorganismos que habitan en el rumen tales como protozoarios, hongos y bacterias (Lovett *et al.*, 2006). El producto final del proceso de fermentación ruminal son los AGV, principalmente acético, propiónico y butírico, que constituyen más del 90% de los ácidos que se producen en el rumen. El propiónico es el único ácido gluconeogénico y es responsable del 65 al 80% del suministro de glucosa (Reynolds *et al.*, 2003), el ácido acético es el que más se produce en el rumen llegando a un 70% o más, el

ácido butírico es el ácido que tiene mayor valor energético molar de los tres AGV más importantes (Maynard *et al.*, 1979), siendo el AGV más metabolizado en el epitelio ruminal, los cuales son absorbidos a través de la pared del rumen (Baldwin y Jesse, 1996; Baldwin y McLeod, 2000).

Otros productos del proceso fermentativo son el CO<sub>2</sub> e hidrógeno (H<sub>2</sub>), los cuales no son utilizados por el rumiante, pero sirven como sustrato para una comunidad particular de microorganismos responsables de producir metano como estrategia metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento (Schäfer *et al.*, 1999). El metano originado por el proceso fermentativo es eliminado por tres vías: 1) es absorbido por sangre y exhalado vía expiración, 2) es emitido directamente del rumen por la eructación y 3) es eliminado por las flatulencias (Ricci *et al.*, 2014). La eliminación de metano vía eructo en el ganado inicia aproximadamente a las cuatro semanas de vida, cuando los alimentos sólidos empiezan a ser retenidos en el retículo-rumen, aumentándose la fermentación y la producción de gases a medida que el retículo-rumen se va desarrollando (Carmona *et al.*, 2005).

#### **2.4 Microorganismos ruminales**

Los rumiantes presentan una comunidad microbiana muy diversa en el interior del rumen la cual comprende varios cientos de especies bacterianas y al menos 30 de estas son predominantes, llegando a cantidades de aproximadamente 10<sup>11</sup> células bacterianas ml<sup>-1</sup>, se pueden encontrar unas 40 especies de protozoarios (10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>) y alrededor de 5 especies de hongos (10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup>) (Hespell y Bryant, 1979).

Los microorganismos ruminales viven en estrecha relación simbiótica con el animal rumiante, el hospedero les ofrece un nicho ambientalmente favorable, con un suministro continuo de alimentos y remoción de productos finales, mientras que los microorganismos proveen un servicio digestivo, que proporciona grandes cantidades de energía disponible al animal hospedero, desempeñan un papel fundamental en la digestión de carbohidratos presentes en las plantas, la conversión de glucosa a AGV, síntesis de proteína bacteriana, de vitaminas del complejo B y K; y digestión de grasas (Miron *et al.*, 2001).

## 2.5 Bacterias metanogénicas

Las bacterias metanogénicas ruminales forman parte de un grupo de microorganismos que son responsables de la degradación de los alimentos, al utilizar los productos finales de la hidrólisis para la formación de metano (Bryant 1979; Demeyer y Fievez, 2000), el cual es producido en el rumen por un grupo altamente especializado de microorganismos, los cuales son anaerobios obligados (Brock *et al.*, 1984), es generado por microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*, un grupo microbial filogenéticamente distinto de las eubacterias (bacterias verdaderas) (Van Soest, 1994; Weimer, 1998). Moss *et al.* (2000) mencionan que divergen unas de otras en algunos aspectos, entre los que resaltan que las *Archaea* no tienen polímeros de peptidoglicanos en su pared celular y los lípidos intracelulares son diferentes en composición, comprende dos reinos: *Euryarchaeaota* (metanogénicos, halófilos extremos y algunos hipertermófilos) y *Crenarchaeota* (Jarrell *et al.*, 1999).

Las *Archaea* metanógenas son microorganismos que se encuentran en el tracto digestivo de rumiantes (Deppenmeier y Muller, 2007), estas colonizan el rumen rápidamente, incluso antes que la dieta contenga material fibroso, en corderos los metanógenos aparecen a los tres o cuatro días de vida y al final de la primera semana las poblaciones son muy parecidas a la de los animales adultos (Skillman *et al.*, 2004).

Algunas de las especies de microorganismos que han sido clasificadas según Klass (1984) se muestran en el Cuadro 1.

#### Cuadro 1. Bacterias metanogénicas

- 
- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| • <i>Methanobacterium formicicum</i>          | • <i>Methanococcus voltae</i>      |
| • <i>Methanobacterium bryantii</i>            | • <i>Methanomicrobium mobile</i>   |
| • <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | • <i>Methanogenium cariaci</i>     |
| • <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>       | • <i>Methanogenium marisnigri</i>  |
| • <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>      | • <i>Methanospirillum hungatei</i> |
| • <i>Methanobrevibacter smithii</i>           | • <i>Methanosarcina barkeri</i>    |
| • <i>Methanococcus vanniellii</i>             |                                    |
- 

Klass (1984).

Los principales metanógenos en el rumen utilizan H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, siendo del género *Methanosarcina* que crecen lentamente en H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, por lo tanto mantienen un nicho distinto mediante la utilización de metanol y metilaminas para producir metano (Hungate *et al.*, 1970; Patterson y Hespell, 1979). El formato, que se forma en la producción de acetato, es utilizado como un sustrato para la metanogénesis, aunque a menudo se convierte rápidamente en H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Hungate *et al.*, 1970; Archer y Harris, 1986).

Los metanógenos representan un único grupo de microorganismos, los cuales poseen tres coenzimas, que no están presentes en otros microorganismos. Estas tres coenzimas son: coenzima 420, involucrada en la transferencia de electrones en lugar de ferredoxina, coenzima M, participa en la transferencia de metilo y el factor B, bajo peso molecular, sensible al oxígeno, coenzima involucrada en la formación de metano de la coenzima metil M (Jones *et al.*, 1987; Baker, 1999), utilizan el proceso de formación de metano para la generación de energía para el crecimiento. Los sustratos utilizados incluyen H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, formiato, acetato, metanol, metilaminas, sulfuro de dimetilo, y algunos alcoholes (Jones 1991; McAllister *et al.*, 1996).

## 2.6 Metanogénesis

La producción de metano en el rumen es un proceso complejo, el cual involucra a bacterias anaeróbicas microbianas y *arqueas* metanógenas para el proceso fermentativo de carbohidratos en el rumen (McAllister *et al.*, 1996), siendo un proceso ineficiente ya que origina pérdidas del 2 – 12 % de la energía bruta que consumen los animales rumiantes (Bryant, 1979), es una ruta metabólica única, donde ocurre una reducción de grupos metilo a metano (Deppenmeier, 2002).

En el rumen existen tres sustratos indispensables para la metanogénesis: CO<sub>2</sub>, compuestos con grupo metilo y acetato, los metanógenos utilizan principalmente H<sub>2</sub> para reducir el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> mediante una serie de reacciones (Leahy *et al.*, 2010), donde el CO<sub>2</sub> es utilizado como fuente de carbono y el H<sub>2</sub> como donador de electrones. El formato también es donador de electrones contribuyendo con el 18% del metano producido en el rumen (Hungate *et al.*, 1970), las metilaminas y el metanol son utilizados para la producción de metano por los órdenes *Metanosarcinal* y *Metanobacterial*, produciéndose a partir del acetato, a través de la vía acetoclástica (Figura 3), siendo esta ruta metabólica utilizada por bacterias del orden *Metanosarcinal* (Janssen y Kirs, 2008).

Según Weimer (1998), la producción de metano es una vía aceptora de electrones, en donde la metanogénesis continuamente remueve H<sub>2</sub>, un producto derivado de la fermentación que al acumularse puede llegar a disminuir la degradación de la materia orgánica. Trabajos realizados por Yokoyama y Johnson. (1993), han demostrado que la producción de metano, en vez de representar ineficiencia para el animal rumiante, promueve una mejor fermentación y mejores rendimientos en la síntesis de ATP al mantener baja la concentración de H<sub>2</sub>, lo cual implica mayor formación de células microbianas aumentando la proteína disponible para el rumiante.

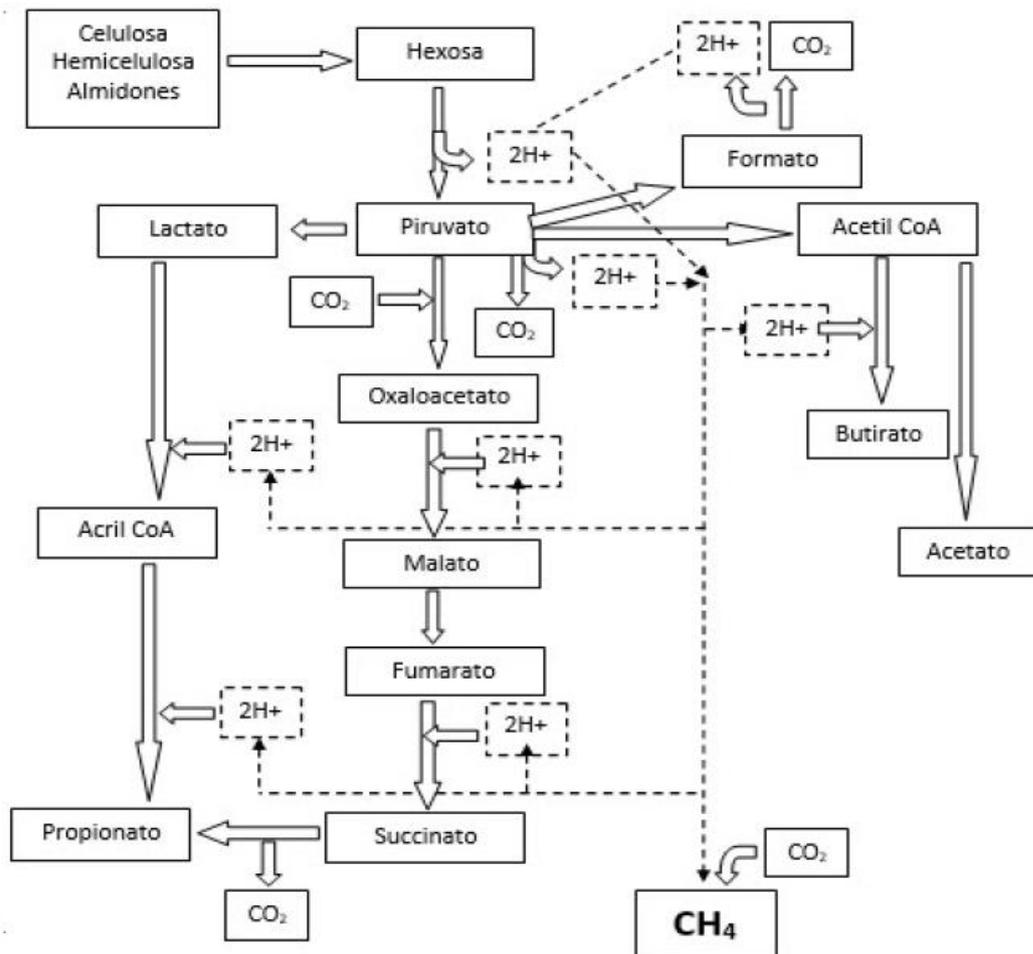


Figura 3. Rutas empleadas en la formación de metano ruminal (Mitsumori y Sun, 2008).

## 2.7 Opciones de mitigación en la producción de metano

Numerosas son las estrategias que se han propuesto para reducir la metanogénesis ruminal (Figura 4), entre las que se incluyen la disminución en el número de rumiantes, la manipulación genética de las bacterias metanogénicas del rumen, el desarrollo de razas de animales que produzcan menos metano y las manipulaciones de la dieta (McAllister y Newbold, 2008), la cual involucra modificaciones en la alimentación, la suplementación, el suministro de aditivos alimenticios (compuestos químicos, ácidos orgánicos), dietas con metabolitos secundarios de plantas (saponinas, taninos) y ácidos grasos insaturados (Sharma, 2005). Investigaciones encaminadas a estudiar el proceso de formación del metano en el rumen y los

factores que intervienen, coinciden en que el nivel de alimentación, los tipos de alimentos empleados y sobre todo su digestibilidad influyen en la cantidad que se produce (Beauchemin y McGinn, 2005). Cuando el ganado es sometido a un sistema de alimentación intensivo se produce menor cantidad de metano que si se encuentra en un sistema extensivo además de encontrarse menor cantidad de bacterias metanogénicas en el rumen de animales que se alimentan con concentrado (Demeyer y Fievez, 2000).

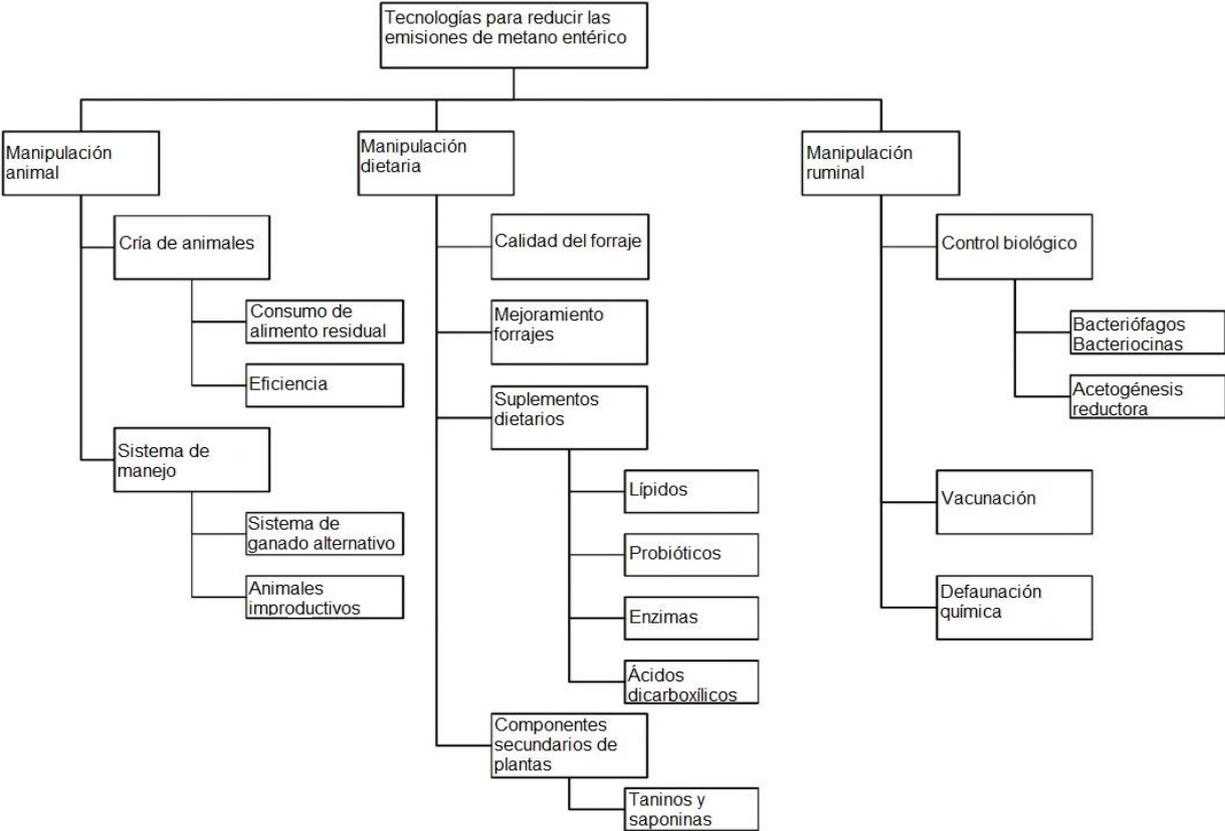


Figura 4. Alternativas empleadas en la disminución de metano entérico  
Adaptado de Eckard *et al.* (2010).

En estudios recientes, una gran variedad de compuestos y sustancias han sido evaluadas por su capacidad de reducción de metano en el rumen (Beauchemin *et al.*, 2008; Buddle *et al.*, 2011; Patra, 2012) incluyendo nitratos, compuestos nitro orgánicos (Anderson *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011), compuestos secundarios de plantas como saponinas, taninos, flavonoides y aceites esenciales, los cuales han sido evaluados como aditivos empleados en la dieta de los animales para mejorar el metabolismo microbiano del rumen, aumentando la eficiencia de la fermentación y

disminuyendo la metanogénesis (McIntosh *et al.*, 2003; Calsamiglia *et al.*, 2007; Patra, 2011).

### **2.7.1 Efecto de la alimentación sobre la producción de metano**

La producción de metano puede ser controlada a través de dos mecanismos: 1) la cantidad de carbohidratos de la dieta fermentados en el rumen y 2) la estequiometría de los AGV producidos, que afecta la disponibilidad de hidrógeno disponible para la producción de metano (Ellis *et al.*, 2008). La producción de éste gas puede disminuirse a través de la manipulación de la dieta, nivel de consumo, tasa de pasaje, presencia de compuestos secundarios, inclusión de aditivos y manipulación de los microorganismos ruminales (Jakhmola *et al.*, 2010; Eckard *et al.*, 2010; Lascano y Cárdenas, 2010). Algunos autores argumentan que es indispensable mejorar la eficiencia de los animales desarrollando estrategias de selección genética o el potenciamiento de la eficiencia alimenticia, lo que disminuiría la producción de metano entérico por unidad de producto (Beukes *et al.*, 2010; Buddle *et al.*, 2011).

### **2.7.2 Composición de la dieta**

Las raciones proporcionadas en la alimentación de rumiantes especialmente el tipo de carbohidratos empleados son de vital importancia en la producción de metano, ya que influyen sobre el pH ruminal alterando la microbiota del rumen (Johnson y Johnson, 1995), su naturaleza y tasa de fermentación influyen sobre los AGV formados y sobre la cantidad de metano producido. La fermentación de las paredes celulares de carbohidratos, producen más metano que la fermentación de azúcares solubles, los cuales a su vez generan mayor cantidad de metano que la fermentación de almidones (Johnson *et al.*, 1996).

Las dietas ricas en almidones favorecen la producción de propionato disminuyendo la cantidad de metano obtenido por unidad de materia orgánica fermentable generando un cambio sobre las bacterias amilolíticas y una disminución en la metanogénesis (Van Kessel y Russell, 1996), mientras que aquellas dietas basadas en forrajes favorecen la producción de acetato llevando a un aumento en la

cantidad de metano por unidad de materia orgánica fermentable (Johnson y Johnson 1995). En un trabajo realizado por Sauvart y Giger-Reverdin, (2007) observaron una relación entre la producción de metano y la cantidad de concentrado administrado en la dieta, al incluir un 80 – 90 % de concentrado encontraron una disminución en metano del 2 – 3 %.

## **2.8 Uso de aditivos para reducir la producción de metano entérico**

### **2.8.1 Ionóforos**

Son compuestos que forman complejos solubles en lípidos con ciertos cationes y facilitan su transporte a través de membranas biológicas (Pressman *et al.*, 1980), son eficaces contra bacterias gram positivas (Nagaraja *et al.*, 1997), incrementando significativamente la producción de propionato a expensas de la producción de acetato y butirato (Jouany 1994; Guan *et al.*, 2006), son añadidos a la dieta de los rumiantes para mejorar la eficiencia en la utilización del alimento (Mathison *et al.*, 1998; Moss *et al.*, 2000) disminuyendo la liberación de hidrógeno de ciertos compuestos como el formiato, de esta forma reducen la producción de metano. Los efectos de los ionóforos sobre la fermentación ruminal, particularmente las proporciones de ácidos grasos volátiles, producción de metano y concentraciones de amoníaco han sido extensivamente documentados en la literatura (Johnson y Johnson, 1995; Guan *et al.*, 2006; Grainger *et al.*, 2008).

### **2.8.2 Monensina sódica**

La monensina sódica es un ionóforo poliéster carboxílico que altera el movimiento de los iones a través de la membrana de las células de las bacterias gram positivas forzándolas a gastar más energía para mantener el pH y el balance de iones intracelular (Bagg, 1997). Es producida por *Streptomyces cinnamonensis* (Brown *et al.*, 1974) y utilizada ampliamente para mejorar la eficiencia en la alimentación de ganado de engorda (Van Nevel, 1991).

Ionoforos como la monensina y lasalocida han mostrado su eficacia en la disminución de las emisiones de metano (Mitsumori y Sun, 2008). Estudios mencionan que alteran la fermentación ruminal mediante el aumento de la

producción de propionato y por la disminución de la producción de metano (Fuller y Johnson, 1981; Barman *et al.*, 2001), reduciendo la producción de ácido láctico (Dennis y Nagaraja, 1981) e incrementando la retención de N (Adams *et al.*, 1981). Además de disminuir la producción de metano en el rumen y de incrementar la producción de propionato inhibiendo el crecimiento de bacterias metanogénicas, sin afectar la producción de AGV ni la degradación de la materia seca (Mbanzamihigo *et al.*, 1996; Galindo *et al.*, 2003).

### **2.8.3 La monensina en la alimentación de rumiantes**

En un estudio realizado por Sauer *et al.* (1998) realizaron un experimento en donde emplearon 24 ppm de monensina sódica en vacas Holstein en ordeño, encontrando una disminución del 21% en la producción de metano, mientras que Odongo *et al.* (2007) emplearon 24 mg de monensina kg MS<sup>-1</sup> en una dieta con una relación forraje:concentrado 60:40 proporcionada a vacas lecheras observando una reducción del 7% en la emisión de metano. Por su parte McGinn *et al.* (2004) reportaron que al emplear monensina a dosis de 33 mg kg MS<sup>-1</sup> en becerros en crecimiento alimentados con dietas basadas en ensilado de cebada se presentó una disminución en metano del 9 %.

## **2.9 Lípidos y aceites**

El uso de lípidos proporcionado en raciones de rumiantes es llevado a cabo con el propósito de disminuir la metanogénesis a través de la inhibición de protozoarios, incrementando la producción de ácido propiónico y la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados (Johnson y Johnson 1995).

En un estudio realizado por Eugene *et al.* (2008) quienes suplementaron a vacas lecheras con el 1 % de lípidos reportaron una disminución del 2.2 % en la producción de metano, mientras que Beauchemin *et al.* (2008) reportaron una reducción del 5.6 % de metano en bovinos y ovinos por unidad de porcentaje de lípidos añadido a la dieta. Jordan *et al.* (2006) emplearon 6 % de aceite de soya refinada en la alimentación de bovinos productores de carne, encontrando una reducción en metano del 39 % en términos de litros por día (l d<sup>-1</sup>), mientras que McGinn *et al.* (2004) y Beauchemin *et al.* (2007) mencionan que el aceite de girasol ha sido a menudo el más estudiado dando como resultados una reducción del 11.5 –

22 % en la metanogénesis. Martin *et al.* (2008) indican que al emplear aceite de linaza en un 5 % en vacas lecheras se presenta una reducción del 55.8 % en gramos de metano por día. El aceite de coco reduce significativamente la producción de metano del 13-73 % dependiendo el nivel de inclusión y la dieta (Machmüller y Kreuzer 1999; Machmüller *et al.*, 2000).

## **2.10 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son un grupo de compuestos secundarios de plantas los cuales son obtenidos a través de procesos de destilación, pueden obtenerse de flores, pétalos, hojas, tallos, frutas, raíces y cortezas; y su concentración de aceite dependerá del estado de madurez y condiciones ambientales (Hart *et al.*, 2008). Poseen la característica de ser antimicrobianos, son utilizados en la fabricación de perfumes, conservantes de alimentos y productos farmacéuticos (Wenk, 2003). Desempeñan un papel protector contra infecciones bacterianas, fúngicas o ataque de insectos, su actividad antimicrobiana es atribuida a una serie de terpenoides y compuestos fenólicos tales como monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos) algunos otros compuestos volátiles incluyen fenilpropenos, limoneno, timol y carvacrol (Helander *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2002; Delamare *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los aceites esenciales alteran el crecimiento bacteriano y el metabolismo de varios tipos de bacterias incluyendo las del rumen (Wallace, 2004), por lo cual pueden ser utilizados como aditivos naturales para rumiantes (Wallace *et al.*, 2002). En estudios realizados *in vitro* han demostrado el potencial de los componentes de los aceites esenciales alterando la fermentación y el metabolismo ruminal disminuyendo de esta forma las emisiones de metano (McIntosh *et al.*, 2003; Busquet *et al.*, 2006; Gunal *et al.*, 2017). Los aceites esenciales pueden ralentizar la degradación del almidón y de las proteínas, disminuyendo el riesgo de acidosis ruminal en bovinos alimentados con altas cantidades de concentrados, además de reducir la cantidad de nitrógeno en rumen inhibiendo la metanogénesis (McIntosh *et al.*, 2003; Calsamiglia *et al.*, 2007; Patra, 2011).

## 2.11 Ácidos grasos

Los ácidos grasos poseen propiedades antimicrobianas y cito tóxicas (Desbois y Smith, 2010), investigaciones realizadas con el objeto de disminuir la producción de metano informan que el ácido laúrico no esterificado (C12) tiene una alta particularidad de potencial en la supresión de la metanogénesis ruminal, seguido por el ácido mirístico (Machmüller y Kreuzer, 1999; Dohme *et al.*, 2001; Soliva *et al.*, 2004), mientras que el ácido palmítico (C16) y el ácido esteárico (C18) no mostraron efecto sobre la metanogénesis ruminal *in vitro* (Dohme *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). Machmüller *et al.* (2003) realizaron un estudio donde emplearon 50 mg kg<sup>-1</sup> de MS de ácido mirístico encontrando una reducción de metano del 22 % en dietas de borregos basadas en forrajes y una disminución del 58 % en dietas a base de concentrado. Por su parte Odongo *et al.* (2007) incluyeron en su estudio 5% de ácido mirístico en vacas lecheras, encontrando una reducción en metano del 36 %.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático es un problema de carácter global por la producción de gases de efecto invernadero y el impacto que presenta el metano producido por el sector agropecuario debido a las consecuencias que conlleva tanto ambientales como socioeconómicas, los niveles de dióxido de carbono y otros gases se han ido incrementando en la atmósfera, generando cambios en el sistema climático, evidenciados por el aumento de las temperaturas, el deshielo y el aumento en el nivel del mar. Debido a esto se han intensificado investigaciones encaminadas a mitigar éstas emisiones de metano de origen entérico, tal es el caso del uso de aditivos químicos como antibióticos, los cuales han mostrado alterar la fermentación ruminal mejorando el consumo y la eficiencia alimenticia además de presentar disminución en la producción de metano, pero el uso de estos ya no es permitido debido a la resistencia bacteriana que generan comprometiendo la salud humana, por lo cual se buscan alternativas alimenticias tales como el uso de plantas que contienen compuestos bioactivos (taninos, saponinas) que presentan actividad antimicrobiana contra una gran variedad de bacterias, protozoarios y hongos, las cuales pueden ser empleadas en la alimentación animal con el objetivo de alterar la fermentación ruminal disminuyendo las emisiones de metano emitidas por los rumiantes. Por tal razón es de importancia evaluar el efecto del uso de metabolitos secundarios de plantas y monensina sódica en la fermentación ruminal *in vitro*.

#### **4. HIPÓTESIS**

La inclusión de hojas de menta, eucalipto y clavo en una dieta adicionada con y sin monensina sódica altera la fermentación ruminal disminuyendo las emisiones de metano *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

### General

Evaluar el efecto de la adición de hojas de menta, eucalipto y clavo en una dieta con y sin monensina sódica en la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*.

### Específicos

Evaluar los cambios en el patrón de fermentación con la inclusión de hojas de menta, eucalipto y clavo en una dieta con y sin monensina sódica en cuanto a la emisión de gases de efecto invernadero *in vitro*.

Determinar la digestibilidad *in vitro* de las dietas adicionadas con hojas de menta, eucalipto, clavo y monensina sódica.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Amecameca (Posta Zootécnica y Laboratorio Multidisciplinario de Investigación) de la Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, Estado de México.

### **6.1. Dietas experimentales**

La dieta empleada para la fermentación *in vitro*, se formuló siguiendo las recomendaciones del NRC (2007) para ovinos, con una ganancia diaria de 250 g (Cuadro 2), la cual contenía 25.7 % grano de maíz, 25 % grano de sorgo, 10 % pasta de soya, 1.3 % urea, 1 % melaza de caña de azúcar, 35 % rastrojo de maíz, 1 % buffer y 1 % núcleo mineral, se elaboraron dietas, las cuales contenían los mismos ingredientes adicionando a cada una el 1, 2 y 3 % de hojas de menta, clavo molido u hojas de eucalipto así como la adición de 0.2 mg kg<sup>-1</sup> de monensina sódica. A las dietas experimentales se les determinó su composición química; materia seca, cenizas y proteína cruda empleando los métodos correspondientes de la AOAC (1990). Por otro lado, la fibra detergente ácido y fibra detergente neutro fueron determinadas como describe Van Soest *et al.* (1991). Se estimó la energía digestible y metabolizable mediante el método propuesto por Osorio *et al.* (2015).

### **6.2. Producción de gas *in vitro***

#### **Inóculo ruminal e incubaciones *in vitro***

El inóculo ruminal para las incubaciones *in vitro* fue colectado de forma prepancial de dos vacas donadoras Holstein fistuladas en rumen, cuya dieta estaba conformada por ensilado de maíz (50%) y una mezcla de veza de invierno con avena forrajera (50%). Se extrajeron 500 ml de líquido ruminal colocándolo en un termo a 39 °C y llevado al laboratorio de Investigación en donde fue filtrado a través de cuatro capas de tela gasa, con la finalidad de obtener únicamente la fracción líquida, e inmediatamente fue saturado con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Se realizó la mezcla de líquido ruminal y solución mineral reducida en una relación 1:9, se utilizaron frascos ámbar con una capacidad de 120 ml, los cuales contenían como sustrato 500 mg de

la dieta molida a un tamaño de partícula de 1 mm; se agregó a cada frasco 90 ml de líquido ruminal estandarizado con un flujo continuo de CO<sub>2</sub> y se cerraron herméticamente. Se incluyeron cuatro frascos como blancos, que solo contenían inóculo ruminal. Los frascos se colocaron en un baño maría a 39 °C y se midió la presión de gas a 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h de incubación empleando un manómetro manual (Theodorou *et al.*, 1994).

**Cuadro 2. Composición de la dieta experimental.**

Ingredientes	% de inclusión en MS
Maíz Grano	25.7
Sorgo grano	25
Pasta de soya	10
Urea	1.3
Melaza de caña de azúcar	1
Maíz Rastrojo	35
Buffer*	1
Núcleo Max Plus**	1
Composición química	
Materia seca, %	89.8
Fibra detergente neutra, %	30.3
Fibra detergente ácido, %	15.7
Cenizas, %	4.6
Proteína Cruda, %	14.8
Digestibilidad, %	79.7
Energía digestible, Mcal kg MS <sup>-1</sup> ‡	2.5
Energía metabolizable, Mcal kg MS <sup>-1</sup> ‡	2.0

‡: Osorio *et al.* (2015). \*Buffer: 95% cenizas, 30% calcio, 5% magnesio, 0.5% azufre, 1.2% sodio, 575 ppm fósforo, 650 ppm potasio, 9.5 ppm boro, 190 ppm flúor, 1825 ppm hierro, 4 ppm cobalto, 16 ppm cobre, 25 ppm zinc, 2.25 ppm molibdeno, 1 ppm selenio, 160 ppm yodo. \*\*Núcleo Max Plus: Vitaminas A, D y E, sulfato de manganeso, sulfato de cobalto, yodo, sulfato ferroso, sulfato de cobre, óxido de zinc, selenito de sodio, flor de azufre, carbonato de calcio, fosfato monocalcico, cloruro de sodio, clinoptilolita (como adsorbente de micotoxinas), bicarbonato de sodio (como buffer), levadura viva, monensina sódica (como ionoforo), saborizante, estimulante del apetito y antioxidante.

Los valores de presión se transformaron a volumen de gas empleando una ecuación de regresión lineal. En cada fracción de tiempo fueron estimados tres parámetros de la cinética de producción de gas, los cuales son: fase lag (h), volumen máximo (Vm) y tasa de producción de gas (S) utilizando el modelo propuesto por Menke y Steingass, (1988) a través de la ecuación:  $V_0 = V_m / (1 + e(2 - 4 * s * (tL)))$

Al finalizar el tiempo de incubación el contenido de los frascos se filtró para determinar la degradabilidad *in vitro* de la materia seca. Para la estimación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se siguió la metodología propuesta por Menke y Steingass, (1988), midiendo el volumen de gas producido a las 0, 6, 12, 18 y 24 h, utilizando una jeringa hipodérmica graduada de 60 mL. En cada medición, el gas atrapado en la jeringa fue transferido por inyección a otro frasco herméticamente cerrado, el cual contenía una solución de hidróxido de sodio, mezclando el gas perfectamente con la finalidad de fijar el bióxido de carbono y formar la sal de bicarbonato de potasio, el gas que no reaccionó retornó a la jeringa midiendo el volumen de gas residual, correspondiendo al volumen de CH<sub>4</sub>, además de gases menores. Por diferencia del volumen inicial menos el volumen residual se estimó el volumen de CO<sub>2</sub>.

### **6.3. Determinación de ácidos grasos volátiles**

Para la determinación de AGV se tomaron 0.8 µl de muestra de cada frasco, la cual fue colocada en una alícuota agregándole 0.2 µl de ácido metafosfórico (25% p/v) en una relación 4:1 y centrifugadas a 11 000 rpm x 20 min determinando la concentración de AGV mediante la técnica de cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961) empleando un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Clarus 580) utilizando una columna capilar de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Agilent Technologies, modelo HP-FFAP) y nitrógeno como gas acarreador.

### **6.4. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos al emplear monensina y un nivel de adición de cada una de las plantas fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, empleando para la comparación de medias la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

Por otra parte, para determinar el efecto de planta y nivel se realizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 x 4, (tres plantas y cuatro niveles 0, 1, 2 y 3 %), estos análisis se realizaron empleando el programa JMP de SAS (Sall *et al.*, 2012).

## 7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras esta investigación son:

- Capítulo de libro titulado “Efecto del aceite esencial y destilado de menta (*Mentha Piperita*) en la fermentación ruminal y la producción de metano *in vitro*” el cual fue publicado en el libro electrónico Perspectivas y avances de la producción animal en México de la Universidad de San Luis Potosí, Lee Rangel, Ramírez Tobías y Roque Jiménez, Editorial Universitaria Potosina, ISBN 978-607-9453-73-2.
- Artículo científico, titulado “EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MENTA (*Mentha piperita*), CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y EUCALIPTO (*Eucalyptus spp*) EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*” el cual fue enviado a la revista Agrociencia.



**UASLP**  
Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí

# **Perspectivas y avances de la producción animal en México**

Héctor Aarón  
Lee Rangel  
Hugo Magdaleno  
Ramírez Tobías  
José Alejandro  
Roque Jiménez



PERSPECTIVAS Y AVANCES DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL EN MÉXICO

Héctor Aarón Lee Rangel  
Hugo Magdaleno Ramírez Tobías  
José Alejandro Roque Jiménez

Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Facultad de Agronomía y Veterinaria

Primera edición, 2016

**ISBN 978-607-9453-73-2**

D.R. © Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Álvaro Obregón 64 Colonia Centro. San Luis Potosí, SLP, México.  
Editorial Universitaria Potosina

La información contenida en cada uno de los capítulos que conforman esta obra es responsabilidad exclusiva de sus autores.

## ÍNDICE

PRESENTACIÓN .....	6
I. NUTRICIÓN Y MANEJO .....	7
DIGESTIBILIDAD APARENTE Y BALANCE DE NITRÓGENO DE OVINOS ALIMENTADOS CON <i>Leucaena leucocephala</i> Y NIVELES CRECIENTES DE <i>Manihot esculenta</i> .....	8
EFECTO DEL NIVEL DE RESIDUO SECO DE CERVECERIA EN LA RACION SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CABRAS EN LACTACION AVANZADA ALIMENTADAS 2 y 4 VECES AL DIA .....	16
PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y HEMATOLÓGICOS DE VACAS SUPLEMENTADAS CON UNA MEZCLA DE MELAZA Y PASTA DE COCO .....	22
ENERGÍA DE LA CANAL Y SU RELACIÓN CON MEDICIONES POR ULTRASONIDO EN OVEJAS DE PELO .....	28
QUALITY AND FATTY ACID PROFILE OF MILK FROM COWS SUPPLEMENTED WITH SOYBEAN OIL IN THE DIET.....	35
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CALIDAD DE LA CANAL DE BECERROS FINALIZADOS CON TRES NIVELES DE UN PRECURSOR GLUCOGENICO .....	43
COMPOSICIÓN DE LA DIETA S DE CABRAS EN PASTOREO EN UN MATORRAL XEROFILO .....	52
EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y CÁSCARA DE NARANJA COMO REDUCTOR DE CORTISOL EN CORDEROS DE ENGORDA EN CONDICIONES DE ESTRÉS .....	59
PRODUCCIÓN DE CARNE Y LECHE EN BOVINOS SUPLEMENTADOS CON BLOQUES MULTINUTRICIONALES EN YUCATÁN.....	67
EFECTO DEL CONSUMO DE BLOQUES MULTINUTRICIONALES SOBRE INDICADORES SANGUÍNEOS DEL METABOLISMO DE ENERGÍA Y PROTEÍNA EN BECERRAS EN CONDICIONES DE PASTOREO .....	73
ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO PROTEGIDO EN DIETA DE CABRAS LACTANTES DE LA COMARCA LAGUNERA: RESPUESTA EN CONSUMO DE MATERIA SECA, PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE .....	81
RESPUESTA PRODUCTIVA DE CONEJOS SUPLEMENTADOS CON <i>Trichanthera gigantea</i> Y <i>Moringa oleifera</i> .....	87
EFECTO EN LA ADICIÓN DE PROPIONATO DE CALCIO Y DE SODIO POR LA SUSTITUCIÓN DE GRANO EN EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE OVINOS EN FINALIZACIÓN .....	94
EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL Y DESTILADO DE MENTA ( <i>MENTHA PIPERITA</i> ) EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y LA PRODUCCIÓN DE METANO <i>IN VITRO</i> .....	102
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CORDEROS ALIMENTADOS CON <i>Moringa oleifera</i> o <i>Trichanthera gigantea</i> BEHAVIOR PRODUCTIVE OF LAMBS FED <i>Moringa oleifera</i> or <i>Trichanthera gigantea</i> .....	109
PARAMETROS PRODUCTIVOS DE CARNE EN CABRAS ADULTAS ALIMENTADAS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO PROTEGIDO EN LA DIETA .....	116
CRECIMIENTO, FINALIZACIÓN, CARACTERIZTICAS DE CANAL Y FERMENTACIÓN RUMINAL EN CORDEROS ALIMENTADOS CON DIETAS ALTAS EN GRANO.....	122

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL Y DESTILADO DE MENTA (*MENTHA PIPERITA*)  
EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*  
EFFECT OF ESSENTIAL OIL AND DISTILLED MINT (*MENTHA PIPERITA*) IN THE  
RUMEN FERMENTATION AND METHANE PRODUCTION *IN VITRO***

Cesar Díaz Galván<sup>1</sup>, Pedro A. Hernández-García<sup>2\*</sup>, Enrique Espinosa Ayala<sup>2</sup>, José A. Martínez  
García<sup>3</sup>, Germán D. Mendoza Martínez<sup>3</sup>, Juan J. Ojeda Carrasco<sup>2</sup>, Gabriela Vázquez Silva<sup>4</sup>

**RESUMEN**

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del aceite esencial y destilado de menta (*Mentha Piperita*) en la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*. Para lo cual se empleó como sustrato alfalfa molida y se agregó 0.5 g en frascos ámbar con una capacidad de 120 ml, a los cuales se les adiciono la dosis de aceite esencial y destilado: 0.5, 1.0 y 1.5 ml, se emplearon cuatro frascos como blancos, incubados a 39 °C registrando las lecturas de presión y volumen de gas a 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h. Se observó un mayor volumen de gas con el uso del destilado (efecto lineal P = 0.031 y cuadrático P = 0.029) en comparación con el aceite esencial, el cual mostro una marcada reducción de gas generado (efecto lineal y cuadrático P=0.0001), a su vez se observa una menor DIVMS con el aceite esencial (efecto lineal y cuadrático P= 0.0001), no se generó producción de CH<sub>4</sub> con el uso de este mismo aceite (efecto lineal y cuadrático P= 0.0001) en comparación con el destilado (efecto cuadrático 0.020) encontrando una

**SUMMARY**

The aim of this study was to evaluate the effect of essential oil and distilled peppermint (*Mentha piperita*) in ruminal fermentation and methane production *in vitro*. For which was used as substrate ground alfalfa and 0.5 g was added in amber bottles with a capacity of 120 ml, to which were added dose of essential and distilled oil: 0.5, 1.0 and 1.5 ml, four jars were used as white, incubated at 39 ° C recorded readings of pressure and volume of gas at 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h. A greater volume of gas was observed with a distillate (linear effect P = 0.031 and quadratic P = 0.029) compared to the essential oil, which showed a marked reduction of generated gas (linear and quadratic effect P = 0.0001), turn one IVDMD lower with the essential oil (linear and quadratic effect P = 0.0001) is observed, no CH<sub>4</sub> production was generated using the same oil (linear and quadratic effect P = 0.0001) compared with the distillate (quadratic effect 0.020) found a decreased CO<sub>2</sub> generated with the essential oil (linear and quadratic effect P =

reducción del CO<sub>2</sub> generado con el aceite esencial (Efecto lineal y cuadrático P =0.0001) en comparación con el destilado (Efecto lineal P =0.006). Por tanto, el empleo del aceite esencial de menta (*Mentha Piperita*) es una alternativa para ser utilizado en la disminución de gas metano, por lo cual se sugiere la realización de futuras investigaciones empleando el mismo aceite con la finalidad de establecer la dosis óptima para la disminución de este gas emitido por la fermentación entérica de los rumiantes.

**Palabras clave:** producción de gas, metano, aceites esenciales.

## INTRODUCCIÓN

La ganadería contribuye cerca del 23% del gas metano global que se deriva de la digestión que realizan los microorganismos de los rumiantes por fermentación entérica y en menor medida por la fermentación de las deposiciones ganaderas (Khalil, 2000), siendo los principales generadores de este gas de efecto invernadero, repercutiendo significativamente al calentamiento global (Lassey, 2007). La generación de este gas ocasiona pérdidas de aproximadamente 6% de la energía bruta que consumen liberando este gas a la atmósfera a través del eructo (DeRamus *et al.*, 2003). Johnson y Johnson (1995), demostraron que el ganado rumiante produce de 250 a 500 litros de CH<sub>4</sub> al día contribuyendo al calentamiento global, debido a diferentes factores tales como el tipo y nivel de consumo de alimento, tipo de carbohidratos, lípidos o ionóforos, entre otros, determinando que la manipulación de estos factores puede reducir e incrementar las emisiones de CH<sub>4</sub> que genera el ganado. Actualmente se ha incrementado el interés de los investigadores por utilizar fuentes alternativas en la alimentación de los rumiantes con el objetivo de disminuir la producción de metano entérico, recientes investigaciones sobre los metabolitos

0.0001) compared with the distillate (linear effect p = 0.006). Therefore the use of essential oil of peppermint (*Mentha piperita*) is an alternative for use in reducing methane gas, so the future research is suggested using the same oil in order to establish the optimal dose for decrease in this gas emitted from enteric fermentation of ruminants.

**Key words:** gas production, methane, essential oils.

secundarios de plantas (Benchaar *et al.*, 2008), han mostrado el potencial que tienen algunos aceites esenciales para promover la fermentación microbiana del rumen presentando actividad antimicrobiana disminuyendo de esta forma la producción de gas metano (Chao y Young, 2000). Por tanto el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del aceite esencial y destilado de menta (*Mentha Piperita*) en la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Universitario UAEM Amecameca (Laboratorio Multidisciplinario de Investigación) de la Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, Estado de México.

*Aceite y destilado de menta.* Para la realización de este estudio se empleó el destilado de menta (*Mentha Piperita*), el cual se obtuvo por procesos de hidrodestilación utilizando hojas y tallos. El aceite esencial empleado fue adquirido comercialmente. Cada uno fue utilizado a dosis 0, 0.5, 1.0 y 1.5 ml en un medio de fermentación *in vitro*.

*Inóculo ruminal e incubaciones in vitro.* El inóculo ruminal para las incubaciones *in vitro* fue colectado de una vaca Holstein canulada, tres horas antes de su alimentación, la cual estaba comprendida por ensilado de maíz (50%) y una mezcla de ebol con avena (50%). Se extrajeron 500 ml de líquido ruminal y se colocó en un termo a 39 °C y llevado al laboratorio de Investigación en donde fue filtrado a través de cuatro capas de tela gasa, con la finalidad de obtener únicamente la fracción líquida, e inmediatamente fue saturado con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Para las incubaciones *in vitro* se realizó la mezcla de líquido ruminal y solución mineral reducida en una relación 1:9, se utilizaron frascos ámbar con una capacidad de 120 ml los cuales contenían como sustrato 0.5 g de alfalfa molida a un tamaño de partícula de 2 mm; se agregó a cada frasco 90 ml de líquido ruminal estandarizado con un flujo continuo de CO<sub>2</sub> y se cerraron herméticamente. Se incluyeron cuatro frascos como blancos, que solo contenían inóculo ruminal. Los frascos se colocaron en un baño maría a 39 °C y se midió la presión de gas a 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h de incubación empleando un manómetro manual (Theodorou *et al.*, 1994).

Los valores de presión se transformaron a volumen de gas empleando una ecuación de regresión lineal. En cada fracción de tiempo fueron estimados tres parámetros de la cinética de producción de gas las cuales son: fase lag (h), volumen máximo (Vm) y tasa de producción de gas (S)

utilizando el modelo propuesto por Menke y Steingass, (1988)  $V_o = V_m / (1 + e^{(2-4 * s * (tL))})$ . Al final del tiempo de incubación se filtraron para estimar la degradabilidad de la materia seca.

La producción total de gas, la proporción de CH<sub>4</sub>, así como la degradabilidad de la materia seca fueron analizados empleando un diseño completamente al azar con un nivel de significancia de P<0.05. Además de analizar por polinomios ortogonales entre tratamientos, efecto lineal y cuadrático (Steel *et al.*, 1997).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observa un mayor volumen de gas con el uso del destilado (efecto lineal P= 0.031 y cuadrático P= 0.029) en comparación con el aceite esencial el cual mostro una marcada reducción de gas generado (Efecto lineal P = 0.0001 y cuadrático P =0.0001), lo cual concuerda con lo reportado por Patra y Yu (2012) quienes encontraron que la inclusión de aceite esencial de menta disminuye la cantidad de volumen de gas y la degradabilidad de la materia seca *in vitro*, por su parte Agarwal *et al.* (2009) mencionan que al incrementar el nivel de aceite disminuye la producción de gas. Además se observa una menor DIVMS con el aceite esencial (efecto lineal P =0.0001 y cuadrático P =0.0001), no se generó producción de CH<sub>4</sub> con el uso de este mismo aceite (efecto lineal P =0.0001 y cuadrático P = 0.0001) en comparación con el destilado (efecto cuadrático P =0.020), lo que concuerda con lo reportado con Canbolat *et al.* (2011; 2012) quienes mencionan que la adición de aceite esencial de menta disminuye la producción de metano *in vitro* encontrando una reducción del CO<sub>2</sub>, generado con el aceite esencial (efecto lineal P = 0.0001 y cuadrático P =0.0001) en comparación con el destilado (efecto lineal P= 0.006).

Cuadro 1. Producción de gas *in vitro* empleando diferentes dosis de aceite en su forma destilada y comercial

	Destilado						Comercial					
	P						P					
	0	0.5	1.0	1.5	Lin	Cua	0.5	1.0	1.5	Lin	Cua	EE
V máx., ml	141.46	154.76	152.66	152.23	0.031	0.029	44.86	36.59	36.26	0.0001	0.0001	1.352
S, %/h	0.031	0.036	0.033	0.032	0.808	0.002	0.030	0.033	0.031	0.866	0.886	0.001
Lag, h	1.290	0.644	0.994	0.835	0.413	0.381	2.848	7.315	7.030	0.270	0.827	1.449
DIVMS, %	75.006	73.916	77.077	74.61	0.576	0.398	54.199	54.231	54.095	0.0001	0.0001	0.406
CH <sub>4</sub> , ml	25.0	28.5	26.0	20.5	0.051	0.020	0	0	0	0.0001	0.0001	0.688
CO <sub>2</sub> , ml	58.83	56.33	61.33	67.33	0.006	0.053	15.83	13.33	9.33	0.0001	0.0001	0.934

Vol máx.: Producción máxima de gas (ml), S= Máxima tasa de producción de gas (ml/h), que se presenta en el punto de inflexión de la curva; L= Fase lag (h), definido como el intercepto del eje-tiempo de la línea de la tangente en el punto de inflexión; DIVMS= Degradabilidad de la materia seca (%), Lin= Efecto Lineal; Cua= Efecto Cuadrático;

EE= Error estándar de la media.

## CONCLUSIONES

La eficiencia del uso del aceite esencial de menta (*Mentha Piperita*) se muestra como una alternativa en la disminución de gas metano en comparación con el uso del destilado, por lo cual se sugiere la realización de futuras investigaciones empleando el mismo aceite con la finalidad de encontrar la dosis óptima para la disminución de este gas emitido por la fermentación entérica de los rumiantes.

## REFERENCIAS

- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., Kamra, D.N., 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed buffalo rumen liquor. *Anim Feed Sci Technol.* 148:321–327.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 145, 209–228.
- Canbolat, O., 2012. The effect of some essential oils on in vitro digestibility, rumen fermentation characteristics and methane gas production. *Iğdır Univ J Inst Sci Tech.* 2:91–98.
- Canbolat, O., Kalkan, H., Karaman, S., Filya, I., 2011. The effect of essential oils on the digestibility, rumen fermentation and microbial protein production. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17:557–565.
- Chao, S.C., and D.G. Young. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12:639–649.
- DeRamus, H.A., Clement, T.C., Giampola, D.D., Dickison, P.C., 2003. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *J. Environ. Qual.* 32, 269–277.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73: 2483-2492.
- Khalil, K.R., 2000. Atmospheric methane: An introduction. In: M. A. K. Khalil (Ed.) *Atmospheric methane, its role in the global environment.* Springer-Verlag, Berlin. p. 1-8.
- Lassey, K.R., 2007. Livestock methane emission: from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agric. Forest Meteorol.* 142, 120–132.
- Menke, K.E., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Development.* 27:7-55.
- Patra, A.K., and Yu, Z., 2012. Effect of essential oil on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of rumen microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4271–4280.
- Steel, G.D.R., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 1997. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach: McGraw-Hill. New York; pp. 637.

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197.

Artículo científico, titulado “EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MENTA (*Mentha piperita*), CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y EUCALIPTO (*Eucalyptus spp*) EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*”.

----- Mensaje reenviado -----

De: Agrociencia Colpos <[agrociencia14@gmail.com](mailto:agrociencia14@gmail.com)>

Para: Pedro hernandez <[pedro\\_abel@yahoo.com](mailto:pedro_abel@yahoo.com)>

Enviado: miércoles, 18 de octubre de 2017 12:54:33 p. m. CDT

Asunto: Re: Fw: Contribución para Agrociencia Ciencia Animal

Le comunico que su manuscrito fue recibido en Agrociencia para la revisión inicial previa al proceso de arbitraje y se le asignó la clave: 17-323.

Título: EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MENTA (*Mentha piperita*), CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y EUCALIPTO (*Eucalyptus spp*) EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*.

Autores: Cesar Díaz Galván, Pedro Abel Hernández García, Enrique Espinosa Ayala, José Antonio Martínez García, Germán Mendoza Martínez, Gabriela Vázquez Silva.

DR. SERGIO S. GONZALEZ MUÑOZ  
DIRECTOR DE AGROCIENCIA

...

**EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MENTA (*Mentha piperita*), CLAVO (*Syzygium aromaticum*) Y EUCALIPTO (*Eucalyptus spp*) EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO***

Cesar Díaz Galván<sup>1,\*</sup>, Pedro Abel Hernández García<sup>2,\*</sup>, Enrique Espinosa Ayala<sup>2</sup>, José Antonio Martínez García<sup>3</sup>, Germán Mendoza Martínez<sup>3</sup>, Gabriela Vázquez Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Autónoma del Estado de México, UAEM Amecameca, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca, Estado de México.

<sup>3</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Ciudad de México.

<sup>4</sup>Departamento de El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Ciudad de México.

## Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto de la inclusión de 1, 2 y 3 % de eucalipto (*Eucalyptus spp*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y menta (*Mentha piperita*), así como 0.2 mg kg<sup>-1</sup> de monensina sódica en una dieta para ovinos, sobre la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*. Se registraron las lecturas de presión y volumen de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h, evaluando volumen máximo de gas, tasa de producción de gas, fase lag, degradabilidad de la materia seca, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y ácidos grasos volátiles (AGV). Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar, comparando las medias con una prueba de Tukey (P<0.05), además de realizar un arreglo factorial 3 x 4, determinando las interacciones entre las tres plantas y los cuatro niveles. Las dietas con monensina sódica y eucalipto presentaron una disminución en el volumen máximo de gas (P=0.0001), así como menor producción de CH<sub>4</sub> (P=0.01) y CO<sub>2</sub> (P=0.004); la producción de AGV mostró diferencias (P=0.01) en ácido acético con el 1 % de eucalipto, además de menor producción de ácido butírico (P=0.01), mientras que con el 2 % aumentó (P=0.01) el ácido propiónico y una menor relación acético:propiónico. Al emplear eucalipto sin monensina, se obtuvo una disminución en tasa de producción de gas (P=0.0008), así como menor producción de gas (P=0.0001) y degradabilidad (P=0.0007), por otro lado al emplear menta la fase lag fue menor (P=0.0001) y se observó mayor reducción en CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (P=0.0001), finalmente la adición del clavo redujo la tasa de producción de gas (P=0.0004). Por lo cual se concluye que el uso de eucalipto al 3 % mostró una disminución en volumen máximo, tasa de producción de gas así como producción de CH<sub>4</sub>, además de incrementar la producción de ácido propiónico.

**Palabras clave:** Productos herbales, gases de efecto invernadero; ionóforo; producción de gas *in vitro*.

## Introducción

Los rumiantes son responsables de la emisión del 15 % del metano global liberado a la atmósfera (Beauchemin y McGinn, 2005), este gas es derivado de la fermentación ruminal y entérica de los carbohidratos estructurales efectuada por una gran diversidad de microorganismos ruminales, principalmente por bacterias metanógenas, pertenecientes al orden de *Methanobacterial*, *Methanomicrobial* y *Methanosarcinal* (Poulsen *et al.*, 2013), cabe hacer mención que el metano presenta un potencial de calentamiento 25 veces mayor al CO<sub>2</sub>, por lo que se considera un gas que contribuye al efecto invernadero y en consecuencia al calentamiento global (Solomon *et al.*, 2007), además del efecto ambiental, este gas en el rumiante ocasiona una pérdida del 2 al 12 % de la energía bruta consumida, dicha variación depende de la cantidad, calidad y composición de la ración (Nkrumah *et al.*, 2006).

Por tales motivos se han intensificado investigaciones para mitigar la emisión de metano (Kumar *et al.*, 2009; Pawar *et al.*, 2014). Diversos estudios reportan que el uso de ionóforos (monensina sódica) han tenido un impacto positivo en la disminución de este gas, debido a que ha mostrado potencial para modificar la fermentación ruminal mediante el aumento de la producción de propionato (Tedeschi *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2009), además se ha reportado que este producto tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias metanogénicas, sin afectar la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), ni la degradación de la materia seca (Galindo *et al.*, 2003).

Otros aditivos que se han empleado para la disminución del metano entérico son los compuestos secundarios de plantas, principalmente compuestos fenólicos como taninos y saponinas (Greathead, 2003; Burt, 2004), plantas como el eucalipto (*Eucalyptus spp*) además de contar con compuestos fenólicos tiene metabolitos como la citronellal (72.8 %) y citronellol (14.5 %), los cuales presentan actividad antimicrobiana (Chao *et al.*, 2000) y por consecuencia disminuyen la producción de metano por la inhibición de bacterias metanogénicas (Sallam *et al.*, 2010). Otra planta con potencial en la disminución de metano es el clavo (*Syzygium aromaticum*) al presentar compuestos como el eugenol en un 83.6 %, acetato de eugenilo en 11.6 % y cariofileno en 4.2 % ya que desnaturalizan proteínas reaccionando a la

presencia de fosfolípidos de la membrana celular, cambiando su permeabilidad y ocasionando la lisis microbiana (Costa *et al.*, 2011; Nonsee *et al.*, 2011), tal situación disminuye las poblaciones bacterianas con potencial metanogénico (Patra y Yu, 2012). Por otra parte la menta (*Mentha piperita*) al contener  $\alpha$ - terpineno 19.7 %, isomentona 10.3 %, trans-carveol 14.5 %, óxido de pipertitona 19.3 % y  $\beta$ - cariofileno 7.6 %, presentan efecto directo sobre la actividad y número de bacterias metanógenas y protozoarios disminuyendo las emisiones de metano (Yadegarinia *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2009).

Estudios realizados con aceites esenciales de clavo, eucalipto, ajo, orégano y menta en pruebas *in vitro* han mostrado su potencial en la disminución de metano, reportando disminución de este gas del 34.4, 17.6, 42.3, 87 y 25.7 % respectivamente, dependiendo del tipo de aceite y la dosis (Patra y Yu, 2012; Ozkan *et al.*, 2015). En un estudio realizado por Sallam *et al.* (2010) al emplear hojas frescas y residuos de eucalipto, encontraron una reducción en la producción de metano del 21 y 16 % respectivamente. Considerando lo antes expuesto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la adición de 1, 2 y 3 % de hojas de eucalipto (*Eucalyptus spp*), clavo molido (*Syzygium aromaticum*) y hojas de menta (*Mentha piperita*) así como monensina sódica ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en una dieta para ovinos sobre los parámetros de fermentación ruminal, degradabilidad de la materia seca, producción de metano y dióxido de carbono empleando producción de gas *in vitro*.

## **Material y Métodos**

La investigación se llevó a cabo en el Centro Universitario UAEM Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México, México.

### **Dietas experimentales**

La dieta empleada para la fermentación *in vitro*, se formuló cumpliendo las recomendaciones del NRC (2007) para ovinos, con una ganancia diaria de 250 g, la cual contenía 25.7 % grano de maíz, 25 % grano de sorgo, 10 % pasta de soya, 1.3 % urea, 1 % melaza de caña de azúcar, 35 % rastrojo de maíz, 1 % buffer y 1 % núcleo mineral, se elaboraron dietas las cuales contenían los mismos ingredientes adicionando a cada una el 1, 2 y 3 % de hojas de menta, clavo molido u hojas de eucalipto así como la adición de  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  de monensina sódica (Cuadro 1); a

estas se les determinó materia seca, cenizas y proteína cruda (AOAC, 1990), la fibra detergente ácido (FDA) y fibra detergente neutro (FDN) fueron determinadas por la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991). Se estimó la energía digestible y metabolizable mediante el método propuesto por Osorio *et al.* (2015).

### **Inóculo ruminal e incubaciones *in vitro***

El inóculo ruminal empleado en la prueba *in vitro* fue colectado prepanchal de dos vacas donadoras Holstein fistuladas en rumen, cuya dieta consistía en ensilado de maíz (50 %) y una mezcla de veza de invierno (25 %) con avena forrajera (25 %). El líquido ruminal se colectó y colocó en un termo a temperatura de 39 °C, posteriormente se trasladó al laboratorio, donde se adicionaron soluciones minerales (Theodorou *et al.*, 1994), con la incorporación de CO<sub>2</sub> continuo asegurando así condiciones anaerobias.

En frascos ámbar (120 ml) se colocó como sustrato 500 mg de la dieta molida a un tamaño de partícula de 1 mm; agregando a cada frasco 90 ml de líquido ruminal estandarizado con un flujo constante de CO<sub>2</sub> y se cerraron herméticamente. Se incluyeron cuatro frascos como blancos (líquido ruminal estandarizado), tanto a los blancos como a los tratamientos se les midió la presión de gas a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h de incubación a 39 °C, empleando un manómetro digital (SSI Technologies, Inc MG-15-A-9V-R). Transcurridos los tiempos de incubación los valores obtenidos de presión fueron transformados a volumen de gas, empleando regresión lineal, en cada fracción de tiempo se estimaron la fase lag (h), volumen máximo (Vm) y tasa de producción de gas (S), utilizando el modelo propuesto por Menke y Steingass, (1988) a través de la ecuación  $V_0 = V_m / (1 + e^{(2 - 4 * s * (tL))})$ .

Al finalizar el tiempo de incubación el contenido de los frascos se filtró para determinar la degradabilidad *in vitro* de la materia seca. La emisión de metano y CO<sub>2</sub> se obtuvo por la metodología descrita por Menke y Steigass (1988).

### **Determinación de ácidos grasos volátiles**

Para determinar los AGV se tomaron 0.8 µl de muestra de cada frasco, la cual fue colocada en una alícuota, adicionándole 0.2 µl de ácido metafosfórico (25 % p/v) en

una relación 4:1 y centrifugadas a 11,000 rpm x 20 min determinando la concentración de AGV mediante la técnica de cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961), empleando un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Clarus 580) utilizando una columna capilar de 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m (Agilent Technologies, modelo HP-FFAP) y nitrógeno como gas acarreador.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos al emplear monensina y un nivel de adición de las plantas fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, empleando la prueba de Tukey para la comparación de medias con una significancia de  $P < 0.05$ . Por otra parte, para determinar el efecto de planta y nivel se realizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 x 4, (tres plantas y cuatro niveles 0, 1, 2 y 3 %), estos análisis se realizaron empleando el programa JMP de SAS (Sall *et al.*, 2012).

**Cuadro 1. Composición de la dieta experimental.**

Ingredientes	% de inclusión en MS
Maíz Grano	25.7
Sorgo grano	25
Pasta de soya	10
Urea	1.3
Melaza de caña de azúcar	1
Maíz Rastrojo	35
Buffer*	1
Núcleo Max Plus**	1
Composición química	
Materia seca, %	89.8
Fibra detergente neutra, %	30.3
Fibra detergente ácido, %	15.7
Cenizas, %	4.6
Proteína Cruda, %	14.8
Digestibilidad, %	79.7
Energía digestible, Mcal kg MS <sup>-1</sup> †	2.5
Energía metabolizable, Mcal kg MS <sup>-1</sup> †	2.0

---

‡: Ozorio *et al.* (2015). \*Buffer: 95% cenizas, 30% calcio, 5% magnesio, 0.5% azufre, 1.2% sodio, 575 ppm fósforo, 650 ppm potasio, 9.5 ppm boro, 190 ppm flúor, 1825 ppm hierro, 4 ppm cobalto, 16 ppm cobre, 25 ppm zinc, 2.25 ppm molibdeno, 1 ppm selenio, 160 ppm yodo. \*\*Núcleo Max Plus: Vitaminas A, D y E, sulfato de manganeso, sulfato de cobalto, yodo, sulfato ferroso, sulfato de cobre, óxido de zinc, selenito de sodio, flor de azufre, carbonato de calcio, fosfato monocalcico, cloruro de sodio, clinoptilolita (como adsorbente de micotoxinas), bicarbonato de sodio (como buffer), levadura viva, monensina sódica (como inoforo), saborizante, estimulante del apetito y antioxidante.

## Resultados y discusión

En cuanto al volumen máximo de gas (Cuadro 2) se observaron diferencias significativas ( $P=0.0001$ ), encontrando que el tratamiento de clavo sin monensina presentó el mayor volumen (18.7 %) con respecto al control sin monensina, en contraste, el uso de eucalipto con monensina mostró el menor volumen (12.8 %) en comparación al control con monensina. Los resultados observados muestran una tendencia similar a lo reportado por Ravindra *et al.* (2009) quienes al emplear aceite esencial de eucalipto en un estudio *in vitro* a dosis de  $1.66 \mu\text{l ml}^{-1}$  encontraron una disminución del 39.7 % en el volumen total de gas, destacando una respuesta elevada debido a que se empleó únicamente el aceite y no la hoja en su totalidad, el aceite de eucalipto altera la fermentación ruminal debido a la presencia de terpenoides y compuestos fenólicos, alterando la población microbiana ruminal, fermentación y metanogénesis. (Chao *et al.*, 2000). La tasa de producción de gas (S) mostró diferencias ( $P=0.0008$ ), ya que el eucalipto sin monensina presentó la menor tasa (6.2 %) con respecto al control sin monensina. La fase lag aumentó con la adición de eucalipto con monensina ( $P=0.0001$ ), mientras que la incorporación de menta sin monensina presentó la menor fase lag.

En cuanto a la producción de  $\text{CH}_4$  ( $P=0.0105$ ) y  $\text{CO}_2$  ( $P=0.0049$ ) se destaca que el eucalipto más monensina disminuyó un 22.3 % el  $\text{CH}_4$  y un 7.6 % el  $\text{CO}_2$  con respecto al control con monensina (Cuadro 2). Estos resultados son similares a los reportados por Sallam *et al.* (2010) quienes al emplear hojas frescas y residuos de eucalipto (después de la extracción del aceite esencial) *in vitro*, encontrando una reducción en metano, la cual fue atribuida al contenido de taninos condensados (proantocianidinas), quienes presentan potencial para reducir la metanogénesis ruminal (Tavendale *et al.*, 2005).

Con respecto a la producción de AGV (Cuadro 2) se observa una modificación ( $P=0.0001$ ) al emplear eucalipto más monensina, disminuyendo el ácido acético en 3.7 % y el butírico en 0.24 %, incrementando el propiónico en 7.6 %, por lo cual se modificó la relación acético:propiónico, dichos resultados concuerdan por lo reportado por De y Sing. (2005) quienes observaron que a una dosis de 200 ppm de monensina empleando líquido ruminal de bovinos previamente adaptados durante un periodo de cinco semanas a dicho ionóforo, reportaron una disminución del 15.8 % en acético, 1.3 % de butírico y el aumento de 27 % en propiónico. En el mismo sentido, Castillejos *et al.* (2008) en condiciones *in vitro* muestran una tendencia similar al emplear 10 mg L<sup>-1</sup> de monensina y aceite de hojas de clavo a dosis de 5, 50 y 500 mg L<sup>-1</sup> de fluido ruminal, reportando una disminución en acético del 9 %, del 24 % de butírico y un incremento del 40.6 % en propiónico, con respecto al control. La disminución de acético e incremento de propiónico puede deberse a que los metabolitos de las plantas afectan a las bacterias celulolíticas disminuyendo así los niveles de H<sup>+</sup> en el medio, el cual es indispensable para los microorganismos metanogénicos disminuyendo así la síntesis de metano (Carulla *et al.*, 2005).

**Cuadro 2. Inclusión de eucalipto, clavo, menta y monensina sódica en los parámetros de fermentación y producción de gas *in vitro*.**

	Control Monensina		Sin monensina			Con monensina			EEM	P
	Sin	Con	Eucalipto	Clavo	Menta	Eucalipto	Clavo	Menta		
Vol máx, ml	114.46 <sup>bc</sup>	108.36 <sup>cd</sup>	110.33 <sup>bcd</sup>	135.93 <sup>a</sup>	126.73 <sup>ab</sup>	94.40 <sup>d</sup>	120.66 <sup>abc</sup>	122.66 <sup>abc</sup>	3.45	0.0001
S, %/h	0.032 <sup>ab</sup>	0.035 <sup>a</sup>	0.030 <sup>b</sup>	0.033 <sup>ab</sup>	0.034 <sup>a</sup>	0.033 <sup>ab</sup>	0.033 <sup>a</sup>	0.034 <sup>a</sup>	0.0006	0.0008
Lag, h	3.8 <sup>bc</sup>	3.7 <sup>bc</sup>	4.2 <sup>b</sup>	3.0 <sup>cd</sup>	2.4 <sup>d</sup>	5.2 <sup>a</sup>	2.6 <sup>d</sup>	3.0 <sup>cd</sup>	0.19	0.0001
DIVMS, %	79.7 <sup>ab</sup>	78.9 <sup>ab</sup>	78.7 <sup>ab</sup>	81.6 <sup>a</sup>	79.4 <sup>ab</sup>	77.7 <sup>b</sup>	80.5 <sup>ab</sup>	80.0 <sup>ab</sup>	0.80	0.0847
CH <sub>4</sub> , ml	30.5 <sup>ab</sup>	33.5 <sup>ab</sup>	27.5 <sup>b</sup>	29.5 <sup>ab</sup>	40.5 <sup>a</sup>	26.0 <sup>b</sup>	34.5 <sup>ab</sup>	31.5 <sup>ab</sup>	2.28	0.0105
CO <sub>2</sub> , ml	59.0 <sup>b</sup>	58.5 <sup>b</sup>	59.0 <sup>b</sup>	68.5 <sup>ab</sup>	62.0 <sup>ab</sup>	54.0 <sup>b</sup>	63.0 <sup>ab</sup>	77.5 <sup>a</sup>	3.36	0.0049
Acético, %	64.04 <sup>a</sup>	60.50 <sup>bc</sup>	64.57 <sup>a</sup>	64.87 <sup>a</sup>	64.67 <sup>a</sup>	58.23 <sup>c</sup>	62.62 <sup>ab</sup>	65.13 <sup>a</sup>	0.60	0.0001
Propiónico, %	24.75 <sup>c</sup>	31.13 <sup>ab</sup>	24.71 <sup>c</sup>	23.16 <sup>c</sup>	24.55 <sup>c</sup>	33.50 <sup>a</sup>	28.69 <sup>b</sup>	23.95 <sup>c</sup>	0.54	0.0001
Butírico, %	11.21 <sup>a</sup>	8.37 <sup>b</sup>	10.71 <sup>a</sup>	11.96 <sup>a</sup>	10.78 <sup>a</sup>	8.35 <sup>b</sup>	8.69 <sup>b</sup>	10.91 <sup>a</sup>	0.27	0.0001
A:P; %	2.59 <sup>a</sup>	1.94 <sup>bc</sup>	2.62 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>	2.64 <sup>a</sup>	1.74 <sup>c</sup>	2.18 <sup>b</sup>	2.72 <sup>a</sup>	0.08	0.0001

Vol máx: producción máxima de gas (ml); S: Máxima tasa de producción de gas (ml/h), que se presenta en el punto de inflexión de la curva; L: Fase lag (h); DIVMS: Degradabilidad de la materia seca (%); EEM: Error estándar de la media; <sup>ab</sup> medias dentro de cada fila con diferente superíndice son significativamente diferentes P<0.05.

En volumen máximo de gas (Cuadro 3) fue modificado por el tipo de planta, nivel e interacción ( $P=0.0001$ ), donde el eucalipto con el 3 % de inclusión presentó una disminución del 13.8 % en comparación al control, resultados similares a lo reportado en un estudio *in vitro* por Patra y Yu (2012) quienes emplearon  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  de aceite esencial de eucalipto, observaron una disminución del 10.3 % en el volumen total de gas. Por su parte Ozkan *et al.* (2015) encontraron una reducción en el volumen total de gas del 48 % al emplear  $1200 \text{ mg L}^{-1}$  de aceite esencial de menta.

En la tasa de producción de gas se observan efectos por planta y nivel ( $P=0.0004$ ) siendo el clavo con 3 % el cual mostró una reducción significativa de gas. En un estudio realizado por Ozkan *et al.* (2015) al emplear aceite esencial de menta encontraron una reducción del 17.3 % en la tasa de producción de gas, atribuyendo el efecto a la composición química del clavo (Costa *et al.*, 2011), ya que presenta actividad antimicrobiana por los compuestos fenólicos (Dorman y Deans, 2000; Rahnama *et al.*, 2012).

Por otra parte se observaron cambios ( $P=0.0002$ ) en la fase lag por planta e interacción, siendo la inclusión de menta con el 1 % la que presentó el menor tiempo de reconocimiento entre microorganismos y sustrato en comparación al control, efecto atribuido a los compuestos fenólicos y metabolitos secundarios, que inciden sobre la actividad y número de metanógenos y *archaeas* (Yadegarinia *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2009).

La degradabilidad *in vitro* de la materia seca mostró efectos ( $P=0.0007$ ) por planta e interacción, observando que al emplear 3 % de eucalipto la degradabilidad se reduce 3.4 % con respecto al control. Lo cual concuerda con lo reportado por Patra y Yu. (2012) quienes emplearon  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  de aceite esencial de eucalipto, observando que la degradabilidad de la materia seca disminuyó en un 3.6 %, por su parte Patra. (2011) sugiere que los aceites esenciales pueden disminuir la degradación de proteína y de almidón por su efecto inhibitorio sobre bacterias amilolíticas y proteolíticas. Del mismo modo Sallam *et al.* (2010) reportan una disminución sobre la degradabilidad de la materia seca y orgánica del 34 al 47 % respectivamente al emplear hojas de

eucalipto, atribuyendo este efecto a los taninos condensados; los cuales disminuyen la población de bacterias celulolíticas (McSweeney *et al.*, 2001).

En cuanto a la producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> se observan efectos por planta (P=0.0001), siendo el eucalipto con el 2 % que presenta una reducción de 7.2 y 25 % respectivamente comparado con el control. En el mismo sentido Kumar *et al.* (2009) reportaron en un estudio *in vitro* una reducción del 56 % de metano con la adición de 1.66 µl ml<sup>-1</sup> de aceite esencial de eucalipto, mientras que Patra y Yu. (2012) reportaron una reducción del 87 % al emplear 1.0 g L<sup>-1</sup> de aceite esencial de orégano.

Con respecto a la producción de AGV, se observa que la inclusión del 3 % de eucalipto modificó el ácido acético disminuyendo en 4.7 %, en cuanto a la producción de ácido propiónico se presentaron efectos por planta, nivel e interacción mostrando un incremento del 17.9 %, el ácido butírico disminuyó en 12.5 % por el efecto de nivel de inclusión, finalmente la relación acético:propiónico se modificó (P=0.01) por planta e interacción. Por su parte Pawar *et al.* (2014) realizaron un estudio *in vitro* empleando aceite esencial de seis plantas: ajo, clavo, limón, cúrcuma, cúrcuma silvestre y canela con cinco dosis: 167, 333, 500, 667 y 833 µl L<sup>-1</sup>, reportando mayores efectos con ajo a dosis de 167 µl L<sup>-1</sup>, presentando una disminución del 5.8 % en la producción de ácido acético, un aumento del 10.8 % en ácido propiónico y una menor relación acético:propiónico.

**Cuadro 3. Efecto de la inclusión de niveles de eucalipto, clavo y menta en los parámetros de fermentación y producción de gas *in vitro*.**

	Eucalipto %				Clavo %			Menta %			EEM	P		
	0	1	2	3	1	2	3	1	2	3		PI	N	PI x N
Vol max, ml	111.41	102.37	97.85	95.96	128.3	124.43	121.1	124.7	122.95	124.25	2.93	***	*	***
S, %/h	0.033	0.031	0.032	0.031	0.033	0.031	0.029	0.034	0.035	0.035	0.0006	***	***	***
Lag, h	3.8	4.8	3.8	3.6	2.8	3.7	3.2	2.78	3.69	3.44	0.23	***	NS	***
DIVMS; %	79.3	78.2	77.5	76.6	81.1	81.26	80.0	79.74	80.33	81.60	0.57	***	NS	***
CH <sub>4</sub> ,ml	32.0	26.7	24.0	26.0	32.0	32.75	27.75	36.0	34.25	36.0	2.07	***	NS	NS
CO <sub>2</sub> , ml	58.7	56.5	54.5	59.0	65.7	62.75	63.5	69.75	70.5	66.75	2.89	***	NS	NS
Acético, %	64.04	64.57	62.46	60.99	64.87	65.24	65.98	64.67	65.17	65.26	0.746	**	NS	*
Propiónico,%	24.75	24.71	26.99	29.19	23.16	23.72	23.99	24.55	23.41	24.03	0.573	**	*	**
Butírico, %	11.21	10.72	10.54	9.81	11.96	11.03	10.02	10.78	11.42	10.71	0.321	NS	**	NS
A:P	2.59	2.62	2.31	2.09	2.80	2.75	2.76	2.64	2.78	2.72	0.091	**	NS	**

Vol max: producción máxima de gas (ml); S: máxima tasa de producción de gas (ml/h), que se presenta en el punto de inflexión de la curva; L: fase lag (h), definido como el intercepto del eje-tiempo de la línea de la tangente en el punto de inflexión; DIVMS: degradabilidad de la materia seca (%); A:P: relación acético propiónico; EEM: error estándar de la media; PI: planta; N: nivel, \* P<0.05, \*\*\* P<0.001, NS: no significativo.

## **Conclusión**

El uso de eucalipto en su inclusión del 3 % mostró una disminución en el volumen máximo, en la tasa de producción de gas así como en la producción de metano, además de incrementar la producción de ácido propiónico, por tal motivo el empleo de esta planta aminora la emisión de gases de efecto invernadero. Por lo cual futuras investigaciones son requeridas para determinar el efecto en estudios *in vivo*.

## Bibliografía

- Agarwal, N. Shekhar, C. Kumar, R. Chaudhary, L., C. Kamra, D., N. 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Tech.* 148 (2), 321-327.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analyses*, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Beauchemin, K., A., and McGinn, S., M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83(3), 653-661.
- Beauchemin, K., A. McGinn, S., M. McAllister, T., A. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 4 (35), 1–18.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microb.* 94 (3), 223–253.
- Carulla, J., E. Kreuzer, M. Machmüller, A. Hess, H., D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56(9), 961-970.
- Castillejos, L. Calsamiglia, S. Martín-Tereso, J. Ter Wijlen, H. 2008. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145(1), 259-270.
- 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(5), 639–649.
- Costa, A., R., T. Amaral M., F., Z., J. Martins, P., M. Paula J., A., M. Fiuza, T., S. Tresvenzol, L., M., F. Paula, J., R. Bara, M., T., F. 2011. Acao do oleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr y L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogenicos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13 (2): 240-245.

- De, D., and Singh, G., P. 2005. Effect of different level of monensin supplemented with cold process urea molasses mineral block on *in vitro* rumen fermentation at different days of adaptation with monensin. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 18(3), 320-325.
- Dorman, H., J., D., and Deans, S., G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88(2), 308-316.
- Erwin, E. Marco, G. Emery, E. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44(9), 1768–1771.
- Galindo, J. Elías, A. Palenzuela, I. Perez, M., D. Aldama, A., I. 2003. Effect of monensin on the *in vitro* methane production in three ruminal ecological systems. Cuban J. Agr. Sci. 37(2), 181-186.
- Greathead, H. 2003. Plant and plant extract for improving animal productivity. Proc. Nutr. Soc. 62(2), 279–290.
- Kumar, R. Kamra, D., N. Agarwal, N. Chaudhary, L., C. 2009. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Anim. Nutr. Feed Techn. 9(2), 237-243.
- McSweeney, C., S. Palmer, B. Bunch, R. Krause, D., O. 2001. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. J. Appl. Microbiol. 90(1), 78-88.
- Menke, K., E., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 27:7-55.
- Nkrumah, J., D. Okine, E., K. Mathison, G., W. Schmid, K. Li, C. Basarab, J., A. Price, M., A. Wang, Z. Moore, S., S. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. J. Anim. Sci. 84(1):145-153.

- Nonsee, K. Supitchaya, C. Thawien, W. 2011. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) oil. *Int. Food Res. J.* 18 (4).
- NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washintong, DC: National Academy Press.
- Osorio A., I. Mendoza, G., D. Plata, P., F. Martinez, J., A. Vargas, L. Ortega, G., C. 2015. A simulation model to predict body weight gain in lambs fed high-grain diets. *Small Ruminant Res.* 123(2), 246–250.
- Ozkan, C., O. Kamalak, A. Atalay, A., I. Tatliyer, A. Kaya, E. 2015. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil on rumen microbial fermentation of barley grain. *J. Appl. Anim. Res.* 43(3), 287-290.
- Patra, A., K. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6, 416-428.
- Patra, A., K., and Yu, Z. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of rumen microbial populations. *Appl. Environ. Microb.* 78(12), 4271-4280.
- Pawar, M., M. Kamra, D., N. Agarwal, N. Chaudhary, L., C. 2014. Effects of essential oils on *in vitro* methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor. *Agric. Res.* 3(1), 67-74.
- Poulsen, M. Schwab, C. Jensen, B., B. Engberg, R., M. Spang, A. Canibe, N. Hojberg, O. Milinovich, G. Fagner, L. Schleper, C. Weckwerth, W., L. Schramm, A. 2013. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emission from bovine rumen. *Nat. Commun.* 4:1428.
- Rahnama, M. Najimi, M. Ali, S. 2012. Antibacterial effects of *Myristica fragrans*, *Zataria multiflora* Boiss, *Syzygium aromaticum*, and *Zingiber officinale* Rosci essential oils, alone and in combination with nisin on *Listeria monocytogenes*. *Comp. Clin. Path.* 21(6), 1313-1316.

- Ravindra, K. Kamra, D., N. Neeta, A. Chaudhary, L., C. 2009. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Nutr. Feed Techn.* 9(2), 237-243.
- Sall, J. Lehman, A. Stephens, M., L. Creighton, L. 2012. *JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP*. SAS Institute.
- Sallam, S., M. Bueno, I., C. Nasser, M., E. Abdalla, A., L. 2010. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission *in vitro*. *Ital. J. Anim. Sci.* 9(3), e58.
- Solomon, S. Quin, D. Manning, M. Chen, Z. Marquis, M. Averyt, K. Miller, H. 2007. The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 235-337.
- Tavendale, M., H. Meagher, L., P. Pacheco, D. Walker, N. Attwood, G., T. Sivakumaran, S. 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. Tech.* 123, 403-419.
- Tedeschi, L., O. Fox, D., G. Tylutki, T., P. 2003. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J. Environ. Qual.* 32(5), 1591-1602.
- Theodorou M., K., B., A. Williams, M., S. Dhanoa, A., B. McAllan. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci.* 48 (3-4):185–197.
- Van Soest, P., J. Robertson, J., B. Lewis, B., A. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

Yadegarinia, D. Gachkar, L. Rezaei, M., B. Taghizadeh, M. Astaneh, S., A. Rasooli, I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), 1249-1255.

## 8. CONCLUSIÓN

El uso de plantas como menta, eucalipto y clavo, disminuyeron los parámetros de fermentación ruminal, situación similar al obtenido con el uso de monensina sódica, se observó que la inclusión de eucalipto al 3 % generó una disminución en el volumen máximo, en la tasa de producción de gas, así como en la producción de metano, además de presentar un incremento sobre la generación de ácido propiónico, por tal motivo el empleo de esta planta aminora la emisión de gases de efecto invernadero.

Los resultados obtenidos con las otras dos plantas también indican una disminución en en la producción de gas y de metano, por tal motivo es necesario realizar futuras investigaciones *in vivo* con diversas dosis.

## 9. LITERATURA CITADA

- Adams, D., C. Galyean, M., L. Kiesling, H., E. Wallace, J., D. Finkner, M., D. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *Journal of Animal Science*, 53 (3), 780-789.
- Anderson, R., C. Huwe, J., K. Smith, D., J. Stanton, T., B. Krueger, N., A. Callaway, T., R. Nisbet, D., J. 2010. Effect of nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2-nitro-methyl-propionate on ruminal methane production and hydrogen balance *in vitro*. *Bioresource technology*, 101 (14), 5345-5349.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analyses, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Archer, D., B. and Harris, J., E. 1986. Methanogenic bacteria and methane production in various habitats. In Society for Applied Bacteriology symposium series. (13), 185-223.
- Bagg, R. 1997. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. Usefulness of Ionophores in Lactating Dairy Cattle, 13-21.
- Baker, S., K. 1999. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50 (8), 1293-1298.
- Baldwin, R. and Jesse, B. W. 1996. Propionate modulation of ruminal ketogenesis. *Journal of Animal Science*, 74 (7), 1694-1700.
- Baldwin, R., T. and McLeod, K., R. 2000. Effects of diet forage: concentrate ratio and metabolizable energy intake on isolated rumen epithelial cell metabolism *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 78 (3), 771-783.
- Banco Mundial. 2010. Economic evaluation of climate change adaptation projects: approaches for the agricultural sector and beyond. Series on Development and Climate Change. Washington.

- Banik, B., K. Durmic, Z. Erskine, W. Nichols, P. Ghamkhar, K. Vercoe, P. 2013. Variability of *in vitro* ruminal fermentation and methanogenic potential in the pasture legume biserrula (*Biserrula pelecinus* L.). *Crop and Pasture Science*, 64 (4), 409-416.
- Barman, K. Mohini, M. Singhal, K., K. 2001. Effect of supplementation of rumensin and level of roughage on methane production. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 18 (4), 325-329.
- Beauchemin, K., A. and McGinn, S., M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science*, 83 (3), 653-661.
- Beauchemin, K., A. Kreuzer, M. O'mara, F. McAllister, T., A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48 (2), 21-27.
- Beauchemin, K., A. McGinn, S., M. Petit, H., V. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87 (3), 431-440.
- Benchaar, C. Calsamiglia, S. Chaves, A., V. Fraser, G., R. Colombatto, D. McAllister, T., A. Beauchemin, K., A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145 (1), 209-228.
- Beukes, P., C. Gregorini, P. Romera, A., J. Levy, G. Waghorn, G., C. 2010. Improving production efficiency as a strategy to mitigate greenhouse gas emissions on pastoral dairy farms in New Zealand. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 136 (3), 358-365.
- Brock DT, Smith WD, Madigan TM. 1984. *Biology of microorganisms*. 4th ed. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice-Hall Inc.
- Brown, H. Carroll, L., H. Elliston, N., G. Grueter, H., P. McAskill, J., W. Olson, R., D. Rathmacher, R., P. 1974. Field evaluation of monensin for improving feed efficiency in feedlot cattle. In *Journal of Animal Science*, 38 (6), 1340-1340.

- Bryant, M., P. 1979. Microbial methane production—theoretical aspects. *Journal of Animal Science*, 48 (1), 193-201.
- Buddle, B., M. Denis, M. Attwood, G., T. Altermann, E. Janssen, P., H. Ronimus, R., S. Wedlock, D., N. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*, 188 (1), 11-17.
- Busquet, M. Calsamiglia, S. Ferret, A. Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89 (2), 761-771.
- Cabrera, M. Duarte, M. Gutiérrez, M., M. Lozano, R., J. 2010. Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero. En: 2ª Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre Cambio Climático. IDEAM. Capítulo 2. Bogotá, Colombia.
- Calsamiglia, S. Busquet, M. Cardozo, P., W. Castillejos, L. Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90 (6), 2580-2595.
- Carmona, J., C. Bolívar, D., M. Giraldo, L., A. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18 (1).
- Chao, S., C. Young, D., G. Oberg, C., J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (5), 639-649.
- Chesson, A. 2006. Phasing out antibiotic feed additives in the EU: worldwide relevance for food production. *Antimicrobial Growth Promoters*, 69-79.
- Church, D. C. D. C. 1974. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes (No. 04; SF768. 2. R8, C4.). Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Comisión Intersecretarial de Cambio Climático CICC. (2007). Estrategia Nacional de Cambio Climático. SEMARNAT, México D.F. 157 pp.

- Delamare, A., P., L. Moschen-Pistorello, I., T. Artico, L. Atti-Serafini, L. Echeverrigaray, S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food chemistry*, 100 (2), 603-608
- Demeyer, D., L. and Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Annales de Zootechnie*, 49:95.
- Dennis, S., M. and Nagaraja, T., G. 1981. Effect of lasalocid or monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. *Journal of Animal Science*, 52 (2), 418-426.
- Deppenmeier, U. 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 71, 223-283.
- Deppenmeier, U. and Müller, V. 2007. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. In *Bioenergetics*. 123-152.
- Desbois, A., P. and Smith, V., J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (6), 1629-1642.
- Dohme, F. Machmüller, A. Wasserfallen, A. Kreuzer, M. 2001. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology*, 32 (1), 47-51.
- Eckard, R., J. Grainger, C. De Klein, C., A., M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Science*, 130 (1), 47-56.
- Ellis, J., L. Dijkstra, J. Kebreab, E. Bannink, A. Odongo, N., E. McBride, B., W. France, J. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *The Journal of Agricultural Science*, 146 (2), 213-233.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2011. DRAFT: Global Anthropogenic Non-CO<sub>2</sub> Greenhouse Gas Emissions: 1990-2030. Publication 430-D-11-003. EPA, Washington, DC.

- EPA (United States Environmental Protection Agency), 2010. Methane and Nitrous Oxide Emissions from Natural Sources. United States Environmental Protection Agency, Office of Atmospheric Programs, Washington, DC, USA, <http://www.epa.gov/methane/pdfs/Methane-and-Nitrous-Oxide-Emissions-From-Natural-Sources.pdf>
- Erwin, E., S. Marco, G., J. Emery, E., M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, *44* (9), 1768-1771.
- Eugène, M. Massé, D. Chiquette, J. Benchaar, C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, *88* (2), 331-337.
- Fuller, J., R. and Johnson, D., E. 1981. Monensin and lasalocid effects on fermentation. *Journal of Animal Science*, *53* (6), 1574-1580.
- Galindo, J. Elías, A. Palenzuela, I. Perez, M., D. Aldama, A., I. 2003. Effect of monensin on the *in vitro* methane production in three ruminal ecological systems. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *37* (2), 181-186.
- Goel, G. Makkar, H., P. Becker, K. 2008. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage-and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*, *147* (1), 72-89.
- Grainger, C. Auld, M., J. Clarke, T. Beauchemin, K., A. McGinn, S., M. Hannah, M., C. Lowe, L., B. 2008. Use of monensin controlled-release capsules to reduce methane emissions and improve milk production of dairy cows offered pasture supplemented with grain. *Journal of Dairy Science*, *91* (3), 1159-1165.
- Guan, H. Wittenberg, K., M. Ominski, K., H. Krause, D., O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, *84* (7), 1896-1906.

- Hammer, K., A. Carson, C., F. Riley, T., V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (6), 985-990.
- Hart, K., J. Yanez-Ruiz, D., R. Duval, S., M. McEwan, N., R. Newbold, C., J. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147 (1), 8-35.
- Hartung, E. and Monteny, G., J. 2000. Methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from animal husbandry. *Agrartechnische Forschung*, 6 (2), 62-115.
- Helander, I., M. Alakomi, H., L. Latva-Kala, K. Mattila-Sandholm, T. Pol, I. Smid, E., J. Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (9), 3590-3595.
- Hespell, R., B. and Bryant, M., P. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on ATP. *Journal of Animal Science*, 49 (6), 1640-1659.
- Hungate, R., E. Smith, W. Bauchop, T. Yu, I. Rabinowitz, J., C. 1970. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*, 102 (2), 389-397.
- Inamdar, A., I. Chaudhary, L., C. Agarwal, N. Kamra, D., N. 2015. Effect of *Madhuca longifolia* and *Terminalia chebula* on methane production and nutrient utilization in buffaloes. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 38-45.
- IPCC, "Intergovernmental panel on climate change," in *Climate Change 2001: A Scientific Basis*, J. T. Houghton, Y. Ding, and D. J. Griggs, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2001.
- Jakhmola, R., C. Taruna, P. Raghuvansi, S., K., S. 2010. Feeding strategies to reduce enteric methane production in ruminants: a review. *Indian Journal of Small Ruminants*, 16 (1), 1-17.

- Janssen, P., H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160 (1), 1-22.
- Janssen, P., H. and Kirs, M. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3619-3625.
- Jarrell, K., F. Bayley, D., P. Correia, J., D. Thomas, N., A. 1999. Recent Excitement about the Archaea: The Archaea are valuable for studying basic biological questions and have novel biotechnology applications. *Bio Science*, 49 (7), 530-541.
- Johnson, D., E. Ward, G., W. Ramsey, J., J. 1996. Livestock methane: current emissions and mitigation potential. *Nutrient Management of Food Animals to Enhance and Protect the Environment*, 219.
- Johnson, K., A. Johnson, D., E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73 (8), 2483-2492.
- Jones, W., J. 1991. Diversity and physiology of methanogens. In J. E. Roger and W. B. Whitman, eds. *Microbial production and consumption of greenhouse gases: Methane, nitrous oxides and halomethane*. Academic Press Inc., New York, NY. 39-54.
- Jones, W., J. Nagle Jr, D., P. Whitman, W., B. 1987. Methanogens and the diversity of archaebacteria. *Microbiological Reviews*, 51 (1), 135.
- Jordan, E. Lovett, D., K. Monahan, F., J. Callan, J. Flynn, B. O'Mara, F., P. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science*, 84 (1), 162-170.
- Jouany, J., P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. In *Annales de Zootechnie*, 43 (1), 49-62.
- Kamra, D., N. Agarwal, N. Sakthivel, P., C. Chaudhary, L., C. 2012. Garlic as a rumen modifier for eco-friendly and economic livestock production. *Journal of Applied Animal Research*, 40 (2), 90-96.

- Klass, D., L. 1984. Methane from anaerobic fermentation. *Science*, 223, 1021-1029.
- Lascano, C., E. and Cárdenas, E. 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 175-182.
- Lassey, K., R. 2007. Livestock methane emission: from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agricultural and Forest Meteorology*, 142 (2), 120-132.
- Leahy, S., C. Kelly, W., J. Altermann, E. Ronimus, R., S. Yeoman, C., J. Pacheco, D., M. Lambie, S., C. 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PloS one*, 5 (1), 1-17.
- Lovett, D., K. Stack, L. Lovell, S. Callan, J. Flynn, B. Hawkins, M. O'Mara, F., P. 2006. Effect of feeding *Yucca schidigera* extract on performance of lactating dairy cows and ruminal fermentation parameters in steers. *Livestock Science*, 102 (1), 23-32.
- Machmüller, A. and Kreuzer, M., C., J., A., S. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 79 (1), 65-72.
- Machmüller, A. Ossowski, D., A. Kreuzer, M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 85 (1), 41-60.
- Machmüller, A. Soliva, C., R. Kreuzer, M. 2003. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*, 90 (3), 529-540.
- Martin, C. Rouel, J. Jouany, J., P. Doreau, M. Chilliard, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*, 86 (10), 2642-2650.

- Mathison, G., W. Okine, E., K. McAllister, T., A. Dong, Y. Galbraith, J. Dmytruk, O., I., N. 1998. Reducing methane emissions from ruminant animals. *Journal of Applied Animal Research*, 14 (1), 1-28.
- Maynard, L., A. Loosli, J., K. Hintz, H., F. Warner, R., G. 1979. *Animal Nutrition*, seventh ed. McGraw Hill Publishing, New York.
- Mbanzamihigo, L. Van Nevel, C., J. Demeyer, D., I. 1996. Lasting effects of monensin on rumen and caecal fermentation in sheep fed a high grain diet. *Animal Feed Science and Technology*, 62 (2), 215-228.
- McAllister, T., A. and Newbold, C., J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48 (2), 7-13.
- McAllister, T., A. Cheng, K., J. Okine, E., K. Mathison, G., W. 1996. Dietary environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76 (2), 231-243.
- McGinn, S., M. Beauchemin, K., A. Coates, T. Colombatto, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*, 82 (11), 3346-3356.
- McGinn, S., M. Chen, D. Loh, Z. Hill, J. Beauchemin, K., A. Denmead, O., T. 2008. Methane emissions from feedlot cattle in Australia and Canada. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48 (2), 183-185.
- McIntosh, F., M. Williams, P. Losa, R. Wallace, R., J. Beever, D., A. Newbold, C., J. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), 5011-5014.
- McMichael, A., J. Powles, J., W. Butler, C., D. Uauy, R. 2007. Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet*, 370 (9594), 1253-1263.
- Menke, K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28: 7-55.

- Miron, J. Ben-Ghedalia, D. Morrison, M. 2001. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84 (6), 1294-1309.
- Mitsumori, M. and Sun, W. 2008. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 21 (1), 144-154.
- Moss, A., R. Jouany, J., P. Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. In *Annales de Zootechnie*, 49 (3), 231-253.
- Murray, R., M. Bryant, A., M. Leng, R., A. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, 36 (1), 1-14.
- Nagaraja, T., G. Newbold, C., J. Van Nevel, C., J. Demeyer, D., I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer Netherlands. 523-632.
- Niggli, U. Fließbach, A. Hepperly, P. Scialabba, N. 2009. Low greenhouse gas agriculture: Mitigation and adaptation potential of sustainable farming systems. *Ökologie & Landbau*, 141, 32-33.
- NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washintong, DC: National Academy Press.
- Odongo, N., E. Bagg, R. Vessie, G. Dick, P. Or-Rashid, M., M. Hook, S., E. McBride, B., W. 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90 (4), 1781-1788.
- Osorio, A., I. Mendoza, G., D. Plata, P., F. Martinez, J., A. Vargas, L. Ortega, G., C. 2015. A simulation model to predict body weight gain in lambs fed high-grain diets. *Small Ruminant Research*. 123 (2), 246–250.
- Owens, F., N. Goetsch, A., L. Church, D. 1993. Fermentación ruminal. El rumiante fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza: Acribia, 159-190.

- Patra, A., K. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 416-428.
- Patra, A., K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184 (4), 1929-1952.
- Patra, A., K. Kamra, D., N. Agarwal, N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128 (3), 276-291.
- Patterson, J., A. and Hespell, R., B. 1979. Trimethylamine and methylamine as growth substrates for rumen bacteria and *Methanosarcina barkeri*. *Current Microbiology*, 3 (2), 79-83.
- Peters, M., Rao, I., Fisher, M., Subbarao, G., Martens, S., Herrero, M., Van der Hoek, R., Schultze-Kraft, R., Miles, J., Castro, A., Graefe, S., Tiemann, T., Ayarza, M., Hyman, G. 2012 . Tropical Forage-based Systems to Mitigate Greenhouse Gas Emissions. Chapter 11, *Eco-Efficiency: From Vision to Reality.*, pp 172-190.
- Pressman, B. C., Painter, G. & Fahim, M. (1980) Molecular and biological properties of ionophores. In: *Inorganic Chemistry in Biology and Medicine* (Marteli, A. E., Ed.), pp. 3-22, American Chemical Society, Washington, DC.
- Reynolds, C., K. Aikman, P., C. Lupoli, B. Humphries, D., J. Beever, D., E. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86 (4), 1201-1217.
- Ricci, P. Chagunda, M., G., G. Rooke, J., M. Houdijk, J., G. Duthie, C., A. Hyslop, J. Waterhouse, A. 2014. Evaluation of the laser methane detector to estimate methane emissions from ewes and steers. *Journal of Animal Science*, 92 (11), 5239-5250.

- Rira, M. Chentli, A. Boufenera, S. Bousseboua, H. 2015. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. *Energy Procedia*, 74, 15-24.
- SAGARPA, 2010. México y el cambio climático; cumbre ministerial de agricultura en la RFA.
- Sall, J. Lehman, A. Stephens, M., L. Creighton, L. 2012. *JMP start statistics: a guide to statistics and data analysis using JMP*. SAS Institute.
- Sauer, F., D. Fellner, V. Kinsman, R. Kramer, J., K. Jackson, H., A. Lee, A., J. Chen, S. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*, 76 (3), 906-914.
- Sauvant, D. and Giger-Reverdin, S. 2007. Empirical modelling by meta-analysis of digestive interactions and CH<sub>4</sub> production in ruminants. *Publication-European Association for Animal Production*, 124, 561.
- Schäfer, G. Engelhard, M. Müller, V. 1999. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (3), 570-620.
- Scheehle, E., A. and Kruger, D. 2006. Global anthropogenic methane and nitrous oxide emissions. *The Energy Journal*, 33-44.
- Sharma, R., K. 2005. Nutritional strategies for reducing methane production by ruminants—a review. *Journal of Research, SKUAST–J*, 4 (1), 1-12.
- Śliwiński, B., J. Kreuzer, M. Wettstein, H., R. Machmüller, A. 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. *Archives of Animal Nutrition*, 56 (6), 379-392.
- Soliva, C., R. Meile, L. Hindrichsen, I., K. Kreuzer, M. Machmüller, A. 2004. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. *Anaerobe*, 10 (5), 269-276.
- Solomon, S. Quin, D. Manning, M. Chen, Z. Marquis, M. Averyt, K. Miller, H. 2007. The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth

- assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 235-337.
- Theodorou, M., K. Williams, B., A. Dhanoa, M., S. McAllan, A., B. France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48 (3-4), 185-197.
- Torrent, J. and Johnson, D., E. 1994. Methane production in the large intestine of sheep. *Publication-European Association for Animal Production*, 76, 391-391.
- US EPA. 2006. Global Anthropogenic Emissions of Non-CO<sub>2</sub> Greenhouse Gases: 1990-2020. EPA Report 430-R-06-003. Accessed Jun. 12, 2012. <http://www.epa.gov/methane/pdfs/Greenhouse GasReport.pdf>.
- Van Kessel, J., A., S. and Russell, J., B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*, 20 (4), 205-210.
- Van Nevel, C., J. 1991. Modification of rumen fermentation by the use of additives. *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*, INRA Editions, Paris, 263-280.
- Van Soest, P., J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, 476.
- Van Soest, P., V. Robertson, J., B. Lewis, B., A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74 (10), 3583-3597.
- Van Vugt, S., J. Waghorn, G., C. Clark, D., A. Woodward, S., L. 2005. Impact of monensin on methane production and performance of cows fed forage diets. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 65, 362-366.
- Wallace, R., J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63 (4), 621-629.

- Wallace, R., J. McEwan, N., R. McIntosh, F., M. Teferedegne, B. Newbold, C., J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15 (10), 1458-1468.
- Weimer, P., J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science*, 76 (12), 3114-3122.
- Wenk, C. 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 16 (2), 282-289.
- Yokoyama, M., T. and Johnson K., A. 1993. Microbiología del rumen e intestino. En: Church DC. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, 137-156.
- Zhang, C., M. Guo, Y., Q. Yuan, Z., P. Wu, Y., M. Wang, J., K. Liu, J., X. Zhu, W., Y. 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 146 (3), 259-269.
- Zhou, Z. Meng, Q. Yu, Z. 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (8), 2634-2639.