

Ruminal methanogenesis and mitigation strategies^ª

Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación

Metanogênese ruminal e estratégias para a sua mitigação

John Fredy Ramírez¹, Zoot, cMSc; Sandra Posada Ochoa^{1*}, Zoot, PhD; Ricardo Noguera¹, Zoot, PhD

* Autor para correspondencia: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Escuela de Producción Agropecuaria. Carrera 75 No. 65 87 Medellín. E-mail: slposada@gmail.com

¹Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA), Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Producción Agropecuaria, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia

(Recibido: 2 de junio, 2014; aceptado: 24 de octubre, 2014)

Abstract

Maintaining rumen fermentation depends on the removal of products generated during food degradation. Volatile Fatty Acids (VFA) are rapidly absorbed by the host animal and used as energy source, while other products such as hydrogen (H₂) and carbon dioxide (CO₂) are used in the rumen by *Archaea* microorganisms to produce methane (CH₄), which is belched by the animal. Methanogenic activity generates the energy required for the survival of methanogens and maintains a low H₂ pressure, creating a favorable environment for the oxidation of reduced cofactors produced during glycolysis. Despite its importance for ruminal degradation, methanogenesis represents loss of energy consumed by the ruminant and its escape to the atmosphere increases total greenhouse gas (GHG) emissions. Reducing rumen emissions of CH₄ can be achieved through feeding strategies, improved animal performance, and the use of feed additives. The aim of this paper is to provide conceptual tools for understanding the origin and importance of methanogenesis in ruminal fermentation and how this process can be modulated without adversely affecting animal productivity.

Key words

Archaea, global warming, greenhouse effect, hydrogen, methane, rumen fermentation (Source: CAB).

^ªPara citar este artículo: Ramírez JF, Posada Ochoa S, Noguera R. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. Rev CES Med Zootec. 2014; Vol 9(2): 307-323.

Resumen

El mantenimiento de la fermentación ruminal depende de la remoción de los productos generados durante la degradación de los alimentos. Los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) son rápidamente absorbidos por el animal hospedero y utilizados como fuente de energía, mientras otros productos como el hidrógeno (H_2) y el dióxido de carbono (CO_2) son utilizados en el rumen por microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* para producir metano (CH_4), el cual es eructado por el animal. La actividad metanogénica genera la energía necesaria para la supervivencia de los metanógenos y mantiene una presión baja de H_2 , creando un ambiente favorable para la oxidación de cofactores reducidos generados durante la glucólisis. A pesar de su importancia para la degradación ruminal de los alimentos, la metanogénesis representa pérdida de la energía consumida por el rumiante y su remoción hacia la atmósfera contribuye al incremento en el total de gases de efecto invernadero (GEI). La reducción de las emisiones de CH_4 desde el rumen puede alcanzarse a través del manejo de la alimentación, el mejoramiento del desempeño productivo de los animales y la utilización de aditivos. El objetivo de este trabajo es ofrecer elementos conceptuales que permitan comprender el origen y la importancia de la metanogénesis en la fermentación ruminal y como este proceso puede ser modulado sin afectar negativamente la productividad animal.

Palabras clave

Archaea, calentamiento global, efecto invernadero, fermentación en el rumen, hidrógeno, metano (Fuente: CAB).

Resumo

A manutenção da fermentação ruminal depende da remoção dos produtos gerados durante a degradação dos alimentos. Os Ácidos Graxos Voláteis (AGV) são rapidamente absorvidos pelo animal hospedeiro e utilizados como fonte de energia, enquanto que outros produtos tais como o hidrogênio (H_2) e o dióxido de carbono (CO_2) são utilizados no rúmen por microorganismos pertencentes ao domínio *Archaea* para produzir metano (CH_4), o qual é expelido pelo animal. A atividade metanogênica gera a energia necessária para a sobrevivência da methanogens e mantém uma baixa pressão de H_2 , criando um ambiente favorável para a oxidação de cofactores reduzidos gerados durante a glicólise. Apesar da sua importância para a degradação ruminal dos alimentos, a methanogenesis representa uma perda significativa da energia consumida pelos ruminantes e sua remoção para a atmosfera contribui ao aumento do total de gases de efeito estufa (GEE). Redução das emissões de CH_4 do rúmen pode ser alcançada através do manejo alimentar, aumento do desempenho produtivo dos animais e utilização de aditivos. O objetivo deste trabalho é fornecer elementos conceituais para compreender a origem e a importância do methanogenesis na fermentação ruminal e como este processo pode ser modulado sem afetar negativamente a produtividade animal.

Palavras-chave

Archaea, aquecimento global, efeito estufa, fermentação ruminal, hidrogênio, metano (Fuente: CAB)

Introducción

Los rumiantes presentan una comunidad microbiana muy diversa dentro de su rumen, la cual está constituida por un consorcio de microorganismos encargados de fermentar el alimento y producir ácidos grasos volátiles (AGV) que son rápidamente absorbidos a través del epitelio ruminal, sirviendo como fuente de energía para el animal hospedero²⁸. Otros productos del proceso fermentativo como dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂) no son utilizados por el rumiante, pero sirven como sustrato para una comunidad particular de microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*, los metanógenos. Éstos producen metano (CH₄) como estrategia metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento⁷².

La actividad metanogénica contribuye notablemente al sostenimiento de la fermentación ruminal, ya que mantiene una baja concentración de H₂ que favorece la oxidación del cofactor reducido nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), producido durante la glucólisis⁴¹, gracias a una relación sintrópica entre los microorganismos productores de H₂ y los metanógenos⁷³. Sin embargo, la metanogénesis representa pérdida de energía para el rumiante y constituye una fuente de emisión de gases de efecto invernadero (GEI)³⁸.

Aunque se calcula que la agricultura tiene un aporte relativamente pequeño a las emisiones de GEI, el CH₄ proveniente de la fermentación entérica representa el 30% del total producido, representando la mayor fuente de emisiones⁷⁶. Esto es relevante si se tiene en cuenta que el CH₄ es el segundo gas más importante para la generación del efecto invernadero, ya que su poder de calentamiento es 21 veces superior al del CO₂³². Por otro lado, la emisión ruminal de CH₄ también se asocia con ineficiencia productiva, ya que este gas representa entre el 2 a 12% de la energía bruta consumida por el animal, variación que puede ser principalmente atribuida a la digestibilidad del alimento³⁷. El objetivo de la presente revisión de literatura es ofrecer elementos conceptuales que permitan comprender el origen y la importancia de la metanogénesis en la fermentación ruminal y como este proceso puede ser modulado sin afectar negativamente la productividad animal.

Producción y destino metabólico del H₂ en el rumen

La degradación ruminal de la fibra y de los almidones genera hexosas, que para su fermentación siguen la ruta de Embden Meyerhof o glucólisis, la cual presenta el siguiente balance neto: $1 \text{ glucosa} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ P}_i + 2 \text{ NAD}^+ \rightarrow 2 \text{ piruvato} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + \text{H}^+$ ⁶¹. El piruvato obtenido en la glucólisis es convertido en AGV, principalmente acético, propiónico y butírico, a través de distintas rutas metabólicas como se observa en la figura 1. El acetil-CoA producido a partir del piruvato por reacciones fosforolíticas es metabolizado a acetato, a través de acetil-fosfato, o a butirato, a través de acetoacetil-CoA. La producción total de NAD en su forma reducida (NADH+H⁺), H₂ y CO₂ por molécula de glucosa fermentada hacia acetato o butirato es: $2 \text{ NADH} + 2 \text{ H}^+$, durante la glucólisis, y $2 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2$, durante la descarboxilación del piruvato, reacción catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (Fd) acoplada a una hidrogenasa. En este balance, una molécula NADH+H⁺ es oxidada durante la reducción del acetoacetil-CoA a butirato⁴¹. Especies del género *Propionibacterium*, *Clostridium propionicum* y *Megasphaera elsdenii* fermentan glucosa o lactato a propionato, acetato y CO₂ ($3 \text{ glucosa} \rightarrow 4 \text{ propionato} + 2 \text{ acetato} + 2 \text{ CO}_2$; $3 \text{ lactato} \rightarrow 2 \text{ propionato} + \text{ acetato} + \text{ CO}_2$), reacciones que se dan a través de las rutas del acrilato o del succinato-propionato⁴¹, las cuales no producen H₂ sino que, por el contrario, los consume.

Producción de CH₄

El H₂ producido durante la glucólisis es perjudicial para el proceso fermentativo, ya que su acumulación inhibe la enzima NADH+H⁺ ferredoxina oxidoreductasa, impidiendo la regeneración de NAD⁺, lo cual sólo es posible a muy baja presión de H₂²⁴. La producción continua de CH₄ representa uno de los mecanismos por los cuales la presión ruminal de H₂ disminuye. En la figura 2 se presenta la relación sintrópica entre *Ruminococcus albus* y metanógenos, favoreciendo la fermentación ruminal.

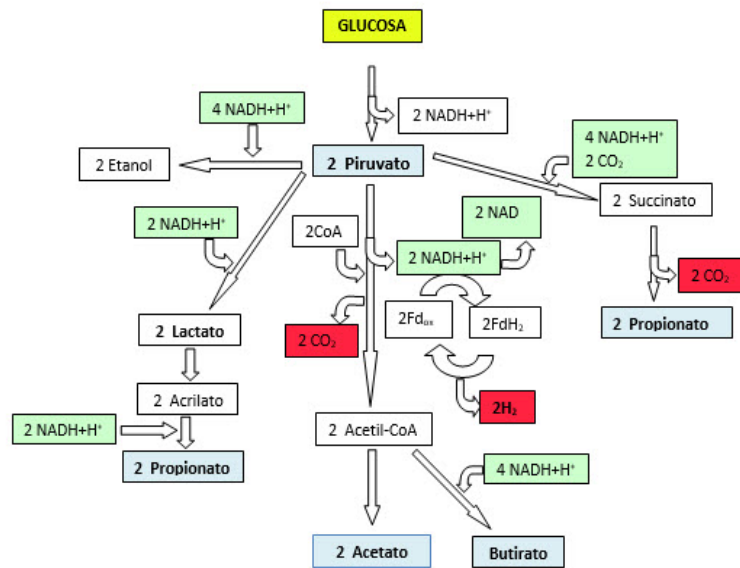


Figura 1. Fermentación ruminal a partir de glucosa (Adaptado de Moss *et al.* ⁵⁷).

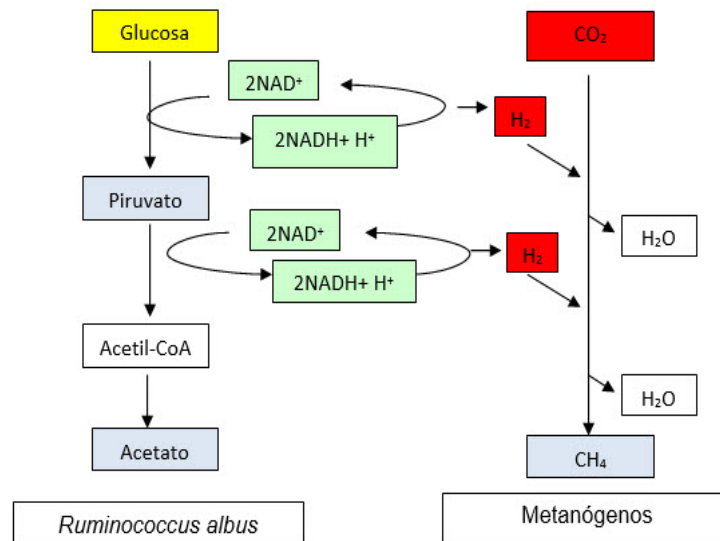


Figura 2. Asociación sintrópica entre *Ruminococcus albus* y metanógenos (Tomado de Kim y Gadd ⁴¹).

Aunque la metanogénesis es la principal estrategia para mantener baja la presión de H₂ en el rumen, no es la única. A continuación se mencionan otros procesos que se tornan relevantes para la captura de H₂ bajo condiciones especiales en el rumen (ej. acidosis ruminal) o cuando existen cantidades suficientes de ciertos sustratos (adición en la dieta).

Transferencia interespecies de H₂ en el rumen

Cuando se realiza un cultivo puro, las bacterias ruminales tienden a producir compuestos como H₂, lactato, etanol y succinato como estrategia para oxidar el NADH+H⁺

Tabla 1. Procesos de reducción a nivel ruminal.

Proceso	Reacción
<p>Producción de etanol</p> <p>El acetaldehído es el aceptor de los electrones generados durante la glucólisis.</p> <p>Se genera ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato.</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> genera 2 ATP por molécula de hexosa, mientras algunas bacterias como <i>Zymomonas mobilis</i>, solo un ATP ⁴¹</p>	
<p>Producción de lactato</p> <p><i>Lactobacillus</i>, <i>Sporolactobacillus</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Enterococcus</i> y <i>Lactococcus</i> utilizan la enzima lactato deshidrogenasa para oxidar el NAD reducido ⁴¹</p>	
<p>Reducción de nitratos</p> <p>El producto final (amoníaco, NH₃) es utilizado por microorganismos como fuente de nitrógeno ⁴¹</p>	$\text{NO}_3^- + \text{XH}_2 \xrightarrow{\text{Nitrato reductasa}} \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{X}$ $\text{NO}_2^- + 3 \text{NADH} + 4\text{H}^+ \xrightarrow{\text{Nitrato reductasa}} \text{NH}_3 + 3 \text{NAD}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$
<p>Reducción de sulfatos</p> <p>Muchas bacterias y <i>Archaea</i> utilizan sulfatos (SO₄²⁻) como aceptor de electrones. Reacción necesaria para la síntesis de componentes orgánicos azufrados (aminoácidos) ⁴¹.</p>	
<p>Biohidrogenación de ácidos grasos</p> <p>Los ácidos grasos insaturados, previa hidrólisis, son hidrogenados y convertidos en ácidos grasos saturados. Los galactoglicéridos del forraje y los triglicéridos del suplemento o los vegetales tienen un alto contenido de ácidos insaturados C₁₈ y la actividad microbiana produce ácido esteárico libre (C_{18:0}), como producto final de la hidrogenación, e isómeros posicionales del ácido oleico, linoleico y linolénico, como productos de hidrogenación incompleta ²⁰. El volumen de H₂ utilizado en este proceso es muy pequeño (3 L/día) ¹²</p>	
<p>Acetogénesis.</p> <p>Los acetógenos utilizan la ruta Wood-Ljungdahl como mecanismo para la conservación de energía y la síntesis de acetil CoA a partir de CO₂. Estos microorganismos convierten H₂ y CO₂ en ácido acético (CH₃COO⁻ + H⁺) ⁶⁹</p>	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$

producido durante la glucólisis; sin embargo, en el rumen, estos mismos microorganismos producen CO₂, CH₄ y AGV ⁴⁴, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de transferencia de H₂ entre las poblaciones ruminales. Este fenómeno, en el cual un organismo captura H₂ producido por otra especie microbiana, implica una relación sintrópica. La sintropía es un caso especial de cooperación simbiótica entre dos tipos de microorganismos

metabólicamente diferentes, que dependen el uno del otro para la degradación de un sustrato ⁷⁴. Iannotti *et al.* ³¹ fueron los primeros investigadores que demostraron la sintropía y transferencia de H₂ entre dos organismos ruminales, utilizando la bacteria formadora de H₂ *Ruminococcus albus* y la bacteria utilizadora de H₂ *Vibrio succinogenes*. La segunda especie obtuvo la energía necesaria para crecer a partir de la reducción del

fumarato a succinato, con la consecuente utilización de H_2 . Laube y Martin ⁴⁵ comprobaron que el monocultivo de una cepa celulolítica (*Acetivibrio cellulolyticus*) produjo etanol, acetato, H_2 y CO_2 , mientras que el cocultivo de la cepa celulolítica con una cepa reductora de sulfatos (*Desulfovibrio sp.*) y otra productora de CH_4 (*Methanosarcina barkeri*) produjo más acetato y menos etanol, además de aumentar la digestibilidad de la celulosa. Estos resultados corroboraron la hipótesis planteada por Hungate ²⁸, quien propuso que los organismos consumidores de H_2 pueden cambiar el flujo de electrones y por consiguiente, los productos finales de la fermentación. Russell y Jeraci ⁷⁰ observaron que la inhibición de la metanogénesis debida a la utilización de monóxido de carbono disminuyó la digestibilidad de la hemicelulosa y la celulosa en un 40 y 27%, respectivamente. Esto indica que las bacterias celulolíticas no pueden alterar fácilmente su metabolismo, generar más productos reducidos o adaptarse a la disminución en la transferencia interespecies de H_2 cuando la comunidad de organismos consumidores del mismo es inhibida. *In vivo*, Fonty et al. ¹⁸ determinaron que el establecimiento de *Metanobrevibacter sp.*, inoculado en corderos criados en condiciones gnotobióticas, estimuló el crecimiento de poblaciones celulolíticas y aumentó la digestibilidad del material evaluado, lo cual pudo estar relacionado con el incremento de la actividad enzimática (glucósido hidrolasas, polisacárido hidrolasas y xilanasas).

La ruta metabólica preferencial de las bacterias celulolíticas contribuye notablemente con la metanogénesis ruminal, a través de la transferencia interespecies de H_2 . La relación entre la utilización de H_2 y la actividad celulolítica se explica porque la mayor parte del $NADH+H^+$, que se forma durante la glucólisis por oxidación del gliceraldehído-3-fosfato, se transforma fácilmente en H_2 y NAD^+ cuando la presión parcial de H_2 es baja ($p_{H_2} < 1 \times 10^3$ atm). Así, más piruvato está disponible para ser oxidado a acetato y CO_2 , vía acetil coenzima A, con la generación de un mol de ATP por mol de acetato formado ⁴⁵. La desaminación de aminoácidos reducidos (leucina, isoleucina y valina) también es afectada por la acumulación de $NADH+H^+$; cuando la relación intracelular de $NADH+H^+/NAD^+$ aumenta, la producción de AGV de cadena ramificada (isobutírico, isovalérico y 2-metilbutírico), necesarios para el crecimiento de bacterias celulolíticas, disminuye dramáticamente ²⁵.

La relación existente entre metanógenos y protozoos constituye otro ejemplo de la transferencia de H_2 entre especies ruminales. Se ha detectado la presencia de metanógenos en la superficie de protozoos ciliados del rumen ⁸⁷ y como endosimbiontes dentro de los mismos ¹⁷. Newbold et al. ⁶⁴ estimaron que la relación entre metanógenos y protozoos ciliados es responsable del 9 al 25% de la metanogénesis en el líquido ruminal. Dado que en el rumen no es posible la respiración aeróbica, los protozoos no contienen mitocondria sino organelas intracelulares denominadas hidrogenosomas donde se libera el H_2 producido durante la oxidación del piruvato o malato ⁵⁸. Se ha observado una estrecha relación entre metanógenos e hidrogenosomas. La ventaja de esta cooperación para el protozoario es evidente: La eliminación de H_2 permite que el protozoo fermente la materia orgánica hasta acetato y CO_2 , evitando la generación de productos reducidos como etanol y lactato; obteniendo una máxima producción de ATP ⁷⁴.

Metanógenos ruminales

Las *Archaea* metanógenas son microorganismos estrictamente anaeróbicos y se encuentran en el tracto digestivo de rumiantes y termitas, sedimentos de ríos y lagos, pantanos, campos de arroz, basureros, alcantarillados, respiraderos hipertermales de aguas profundas e incluso en ambientes hipersalinos ¹⁵. Los metanógenos colonizan el rumen rápidamente, incluso antes que la dieta contenga material forrajero, y las poblaciones alcanzan su máxima densidad (10^9 células/ml) alrededor del día 21 de vida. 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 las encontradas en animales adultos ⁷⁷.

La utilización de técnicas para la amplificación de secuencias de ADN ha revelado que los metanógenos predominantes en la colonización del rumen pertenecen al orden *Metanobacterial*, mientras que los órdenes *Metanosarcinal*, *Metanomicrobial* y *Metanococcal* están presentes en niveles muy bajos ⁷⁷. Algunos autores reportan que en animales adultos los órdenes *Metanosarcinal* y *Metanomicrobial* no son detectados ⁸⁸, mientras que otros investigadores reportan que menos del 3% del ADN recuperado tiene su origen en el orden *Metanosarcinal* ⁷⁵. Según análisis de RNA ribosomal de muestras de todo el mundo, los metanógenos ruminales

pueden ser divididos en tres grupos principales: *Metanobrevibacter spp.*, *Metanomicrobium spp.* y un grupo de *Archaea*, no cultivado, denominado rumen clúster C. Janssen y Kirs³⁵ encontraron que el 61,6% de las secuencias genéticas de *Archaea* ruminales están relacionadas con *Metanobrevibacter*, siendo las especies *M. gottschalkii* (33,6%) y *M. ruminantium* (27,3%) las más predominantes.

Los metanógenos son los únicos microorganismos conocidos que pueden producir dos gradientes de iones ($\Delta\mu\text{Na}^+$ y $\Delta\mu\text{H}^+$) a través de su membrana celular al mismo tiempo. Gracias a esta fuerza, una ATP sintetasa (A_1A_0) cataliza la síntesis de ATP desde ADP + Pi aprovechando el gradiente electroquímico de protones^{59, 72}. El cambio de energía libre ($\Delta G_o'$) asociado con la metanogénesis permite la síntesis de máximo dos moles de ATP bajo condiciones controladas, pero bajo condiciones medioambientales se genera menos de una mol de ATP por mol de CH_4 producido. Por lo tanto, los metanógenos viven cerca al límite termodinámico¹⁵.

El CH_4 producido por los metanógenos es un producto final de la degradación de la materia orgánica en ambientes anaeróbicos donde las concentraciones de sulfato, nitrato, manganeso o hierro son bajas⁸⁰. En ambientes distintos al rumen, con altas concentraciones de estos aceptores de electrones, la metanogénesis se convierte en una reacción termodinámicamente ineficiente. La fermentación es un proceso menos exergónico que la degradación aeróbica o la respiración anaerobia alternativa. La conversión de hexosas a CO_2 y CH_4 sólo libera el 15% de la energía que está disponible en la degradación aeróbica. Este bajo rendimiento energético puede ser la razón por la cual la metanogénesis es la última reacción que ocurre después que los otros aceptores de electrones se han reducido⁷⁴.

Metanogénesis ruminal

En el rumen existen principalmente tres sustratos para la metanogénesis: CO_2 , compuestos con grupo metilo y acetato. Sin embargo y como se observa en la Figura 3, los metanógenos ruminales utilizan principalmente H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 en una serie de reacciones acopladas a la síntesis de ATP⁴⁶, donde el CO_2 es utilizado como fuente de carbono y el H_2 como el principal donador de electrones. El formato también es un donador importante de electrones y puede llegar a contribuir con el 18% del CH_4 producido en el rumen²⁹. Aunque las metilaminas

y el metanol también pueden ser utilizados para la producción de CH_4 por los órdenes *Metanosarcinal* y *Metanobacterial*, su contribución en la metanogénesis total es muy pequeña³⁵. También se puede producir CH_4 a partir del acetato, a través de la vía acetilástica, pero al igual que la reducción del grupo metilo, esta ruta metabólica es sólo utilizada por miembros del orden *Metanosarcinal*³⁵. Además, el acetato es rápidamente absorbido y utilizado por el rumiante; así que su participación en la producción total de metano es mínima.

El proceso de metanogénesis ruminal a partir de CO_2 , H_2 y formato (4HCOO^-) puede resumirse con las siguientes ecuaciones⁵:



Impacto de la concentración de H_2 sobre la fermentación ruminal

La presión parcial de H_2 (p_{H_2}) se relaciona con la concentración de iones H^+ (pH) y con el potencial redox (E_h) del rumen según la ecuación propuesta por Sauer y Teather⁷¹, $E_h = 0,062 * \log [\text{H}^+]/p_{\text{H}_2}$. En condiciones normales, las concentraciones de H_2 disuelto en el rumen varían en un rango de 0,1 a 50 μM , siendo altas cuando se incluyen granos en la dieta o inmediatamente después de la ingesta. Los metanógenos son muy sensibles a los cambios en las concentraciones de H_2 y su máxima tasa de crecimiento es alcanzada alrededor de 1 μM ²⁸.

La p_{H_2} tiene un fuerte efecto sobre las rutas de fermentación que utilizan o producen H_2 . Algunos autores^{10, 40} han demostrado que los microorganismos pueden cambiar sus patrones de fermentación, incluso en respuesta a pequeñas diferencias en la conservación de energía, dejando de utilizar rutas termodinámicamente menos favorables. En consecuencia, aquellas rutas generadoras de H_2 se vuelven desfavorables en condiciones de alta concentración de H_2 favoreciéndose la formación de propionato³⁴. Esto sugiere que las rutas para la formación de butirato + H_2 o de acetato + butirato + H_2 sólo son favorables en bajas concentraciones de H_2 . Por otro lado, el aumento en la p_{H_2} también reduce la desaminación de aminoácidos reducidos (incluyendo los de cadena ramificada) sin afectar aminoácidos neutros u oxidados. La disminución en la desaminación

de algunos aminoácidos en condiciones de alta p_{H_2} puede evidenciarse con el descenso de la producción de amoníaco y AGV de cadena ramificada (isobutirato e isovalerato) ²⁵.

Estrategias para reducir la producción de CH_4 en el rumen

La producción ruminal de CH_4 resulta en la conversión ineficiente de la energía contenida en el alimento, lo que se traduce en menor retención de la misma por parte del animal hospedero. Algunos autores ³² calculan que la producción de CH_4 en vacas lecheras fluctúa entre 40 kg/animal/año, en África y Medio Oriente, y 121 kg/animal/año en América del norte, producciones que

contribuyen significativamente al calentamiento global. De allí que incrementar la eficiencia digestiva mejoraría el desempeño animal, al tiempo que reduciría los impactos ambientales de la producción ganadera.

Debido a que el CH_4 es un producto final de la degradación del alimento en el rumen, las estrategias para reducir sus emisiones implican alterar los patrones de fermentación, reduciendo la producción de H_2 y formiato, principales precursores para la metanogénesis en el rumen. Cualquier método para suprimir la producción de CH_4 en el rumen debe estar acompañado por un método para convertir el H_2 producido en otro producto de fermentación; de lo contrario y como se ha mencionado, la acumulación de H_2 podría detener la degradación ruminal.

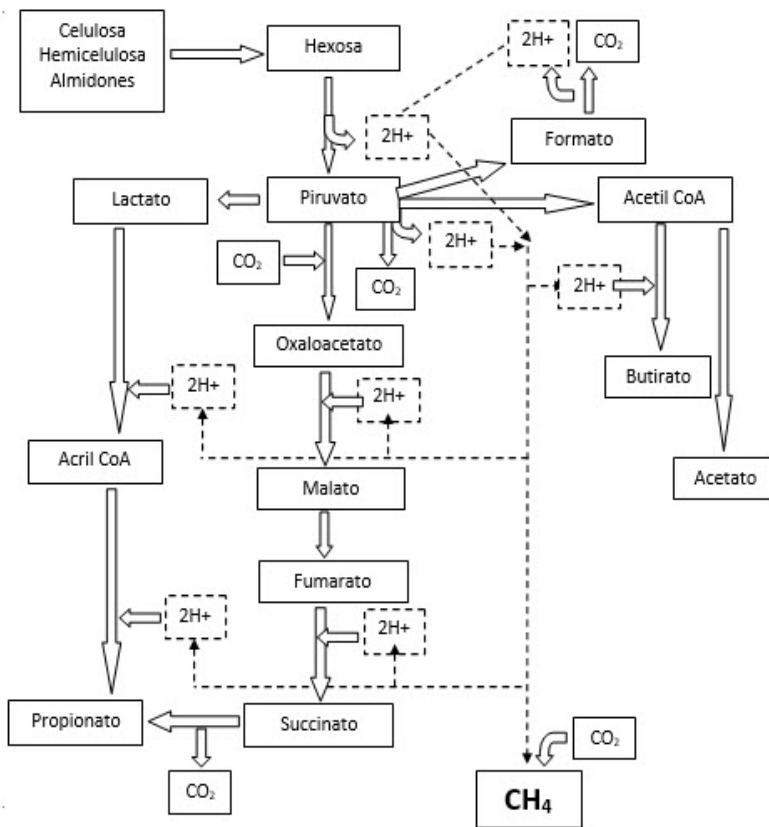


Figura 3. Principales rutas para la producción de CH_4 en el rumen (Tomado de Mitsumori y Sun ⁵⁵)

Nivel de alimentación

Blaxter y Clapperton ⁴ demostraron que la producción de CH₄ (kJ/100 kJ consumidos) disminuyó al incrementarse el consumo. Consumos al nivel de mantenimiento aumentan la producción de CH₄ porque la digestibilidad aparente de la ración aumenta, pero ocurre lo contrario cuando el nivel de alimentación es tres veces el de mantenimiento. La composición del forraje puede tener un efecto indirecto sobre la producción de CH₄, ya que forrajes con bajo contenido de fibra pueden aumentar el consumo, lo cual se traduce en menores emisiones de CH₄ por unidad de alimento ingerido ²². Matsuyama *et al.* ⁵³ corroboraron indirectamente esta hipótesis al determinar que la reducción del tiempo de retención del alimento en el rumen reduce la producción de CH₄.

Tipo de carbohidratos

Los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa) son fermentados a un ritmo menor que los no estructurales (almidón, azúcares), produciendo más CH₄ por unidad de sustrato fermentado ^{11,26}. Es ampliamente aceptado que las dietas basadas en granos reducen las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida, en comparación con las dietas forrajeras ³⁸, debido fundamentalmente a tres razones: a) aumento en la producción de propionato, que provee una ruta metabólica que consume H₂ y por tanto, reduce el sustrato disponible para la metanogénesis ⁶⁰; b) disminución del pH ruminal con la consecuente inhibición del crecimiento de metanógenos en el rumen ^{43,67,86}; c) disminución del número de protozoarios debido al incremento de la tasa de pasaje, limitando la transferencia de H₂ desde éstos a los metanógenos ⁸⁹.

Es aceptado que el tipo de polímeros presentes en la dieta determina los productos finales de la fermentación debido a una restricción genética para la expresión de las distintas rutas metabólicas en los microorganismos. Se espera que dietas ricas en forrajes sean más productoras de CH₄ debido a que, genéticamente, los microorganismos celulolíticos producen más acetato e H₂ que las poblaciones amilolíticas (productoras de menos H₂ y más propionato). Sin embargo, ésta no es una explicación definitiva ya que el genoma microbiano es dinámico y podría existir transferencia horizontal de genes que den lugar a la coexistencia de diferentes rutas de fermentación ³⁴.

En cabras, mediante calorimetría indirecta, López *et al.* ⁴⁹ encontraron que el aumento del nivel de almidón (29% vs. 14%) en dietas isoenergéticas redujo la producción de CH₄ alrededor de 12,93 g/día, sin efectos negativos sobre la producción y la composición de la leche. Moe y Tyrrell ⁵⁶ y Johnson y Johnson ³⁸ sugieren que la fermentación de las paredes celulares (FDN) conduce a una mayor producción de CH₄ que la fermentación de los componentes intracelulares. Sin embargo, Hammond *et al.* ²³, después de analizar una base de datos de 3000 animales (ovejas y vacas), encontraron que solo el 13% de la variación en la producción de CH₄ pudo ser explicada por la composición del pasto.

Procesamiento del alimento

Navarro-Villa *et al.* ⁶³ encontraron que el proceso de ensilaje redujo la producción *in vitro* de CH₄ (ml/g de MS degradada) y la fermentación acética (p<0,05), aumentando la producción de ácido propiónico. Este fenómeno pudo explicarse por la transformación de los carbohidratos solubles del forraje en ácido láctico durante el proceso de ensilaje, lo cual favorece la producción de ácido propiónico en una ruta no metanogénica que consume H₂.

Hales *et al.* ²¹ encontraron que el procesamiento del grano también tuvo efecto sobre la producción de CH₄, con una disminución cercana al 20% cuando se utilizaron hojuelas de maíz tratadas con vapor en comparación con grano molido. Esto pudo deberse a una degradación más eficiente de los almidones en el rumen cuando se consumen almidones procesados.

Desempeño animal

Zhou *et al.* ⁹² indicaron que la comunidad metanogénica varía en función de la eficiencia alimenticia del hospedero; así, el ganado más eficiente produce menos CH₄. Zhou *et al.* ⁹¹ encontraron que tanto cepas como genotipos de las poblaciones metanogénicas están relacionadas con la eficiencia productiva del ganado y, aunque no detectaron diferencias en la población total de metanógenos, encontraron alta prevalencia de *Metanosphaera stadtmanae* y *Metanobrevibacter spp* en animales ineficientes.

El mejoramiento genético para rasgos asociados a la productividad puede reducir significativamente las emisiones de CH₄. Aumentos en el tamaño de la camada en ovejas se asocian con una reducción en la producción de CH₄ comparable a la que se puede lograr con cambios en la dieta³⁰. Con el incremento de la productividad, las emisiones de CH₄ por animal aumentan, mientras la cantidad de CH₄ por kilogramo de leche o carne disminuye, registrándose una reducción en el CH₄ total al disminuir el número de animales requeridos para generar una determinada cantidad de producto. Se ha estimado que los programas de selección genética en diez años podrían reducir la emisión de CH₄, expresada en kg/lactancia y en g/kg de grasa y proteína en leche, un 11 y 26%, respectivamente¹⁴.

Utilización de aditivos

Los compuestos utilizados para disminuir la producción de CH₄ en el rumen pueden ser divididos de acuerdo a su mecanismo de acción: a) aquellos que direccionan las moléculas de H₂ hacia productos diferentes al CH₄ y, b) aquellos que inhiben directamente el crecimiento o metabolismo de los metanógenos. En el primer grupo se incluyen nitratos, sulfatos, fumarato, ionóforos y taninos; en el segundo, aceites esenciales, análogos de la coenzima M e inhibidores de la enzima Hidroximetilglutaril-SCoA (HMG-CoA) reductasa. Los ácidos grasos de cadena media y larga ejercen su acción a través de ambos mecanismos^{19, 68, 78}.

Nitratos y sulfatos. Algunos autores^{52,79,85} han reportado que la reducción de sulfatos y nitratos representa una ruta alternativa para la utilización de H₂; sin embargo, debido a los bajos niveles de estos compuestos en el rumen no compiten con la producción de CH₄, por lo que se ha propuesto su utilización como aditivos antimetanogénicos en la dieta. La reducción del nitrato (producción de nitrito) y del nitrito (producción de amoníaco) son vías que consumen cuatro H₂ por mol de nitrato reducida. Sin embargo, cuando los rumiantes son alimentados con dietas altas en nitratos, los nitritos tienden a acumularse, porque la reducción del nitrato a nitrito es 2,5 veces más rápida que la reducción de nitritos a amoníaco³³. Los nitritos pueden llegar a la sangre y transformar la hemoglobina en metahemoglobina, con la consecuente disminución del transporte de oxígeno¹³.

Por lo tanto, la aplicación de nitrato, aunque es una

alternativa eficiente para reducir la producción de CH₄, debe considerar períodos de adaptación para evitar intoxicación por nitritos. Alaboudi y Jones¹ determinaron que la adaptación gradual durante 10 semanas a dietas altas en nitrato (1,5 g de nitrato/kg de peso vivo/día) no provocó signos clínicos de metahemoglobinemia. En algunos ambientes anaeróbicos parece que el sulfuro de hidrógeno actúa como donador de electrones en la reducción de nitritos a amoníaco²⁷, así que la suplementación de la dieta con azufre puede reducir la acumulación de nitrito en el rumen⁴⁷.

Fumarato. Se ha estimado que en el rumen la reducción del fumarato puede ser más exergónica que la metanogénesis⁸¹, lo cual hace que esta ruta compita directamente con la producción de CH₄. Sin embargo, evaluaciones *in vitro* han demostrado una baja efectividad, pues se ha calculado una reducción de 0,037 μmol de CH₄ por μmol de fumárico adicionado, mientras estequiométricamente la reducción debería ser de 0,25 μmol de CH₄⁸², lo cual supone una utilización incompleta del fumarato. Se ha demostrado^{2, 50} que el succinato, metabolito intermedio de la transformación de fumarato a propionato, tiende a acumularse cuando se utilizan altas cantidades de fumarato, lo cual hace que la reducción del fumarato se vuelva termodinámicamente menos favorable, afectando su capacidad para competir con la metanogénesis.

Ionóforos. Monensina y lasalocida son unos de los compuestos más eficaces disminuyendo la emisión de CH₄ y alterando la fermentación ruminal⁵⁵. Los ionóforos son antibióticos muy eficaces contra bacterias Gram positivas y presentan poco o ninguna actividad contra las bacterias Gram negativas y metanógenos en el rumen⁶². El espectro antimicrobiano de los ionóforos puede deducirse del hecho que bacterias productoras de H₂ y formato (*Lachnospira multiparus*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*), de butirato (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium cellulosolvens* y *Eubacterium ruminantium*), de lactato (*Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus vitulinus* y *Streptococcus bovis*) y de amoníaco (*Clostridium aminophilum*, *Clostridium sticklandii* y *Peptostreptococcus anaerobius*) son susceptibles a los ionóforos, mientras que bacterias productoras de succinato y propionato (*Anaerovibrio lipolytica*, *Fibrobacter succinogenes*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Succinimonas amylolytica* y *Succinivibrio dextrinosolvens*) son resistentes⁶².

Taninos. Los taninos, hidrolizables y condensados, son polímeros polifenólicos de alto peso molecular que han sido reconocidos como agentes moduladores favorables de la fermentación ruminal. Estos reducen la digestibilidad de las proteínas en el rumen, previenen el timpanismo, inhiben la metanogénesis y aumentan las concentraciones de ácido linoleico conjugado en los alimentos derivados de los rumiantes⁶⁶. Jayanegara, et al.³⁶, a través de metaanálisis, concluyeron que el incremento en el nivel de taninos en la dieta disminuyó las emisiones de CH₄, sin embargo, los efectos claros y confiables sólo fueron alcanzados con niveles superiores a 20 g/kg MS, un umbral que a menudo no es excedido en dietas comerciales suplementadas con taninos.

Aceites esenciales. Los extractos de las plantas contienen algunos metabolitos secundarios, como los aceites esenciales, que tienen propiedades antimicrobianas. Aunque la información entre estudios no es consistente, los aceites esenciales potencialmente podrían reducir la producción de CH₄ debido a la inhibición selectiva del crecimiento de los protozoos, que conviven en estrecha sintropía con los metanógenos³. Un mecanismo diferente es indicado por Busquet et al.⁸, quienes proponen que los compuestos organosulfurados, como el dialil disulfuro presente en el aceite de ajo, pueden ejercer una inhibición específica de algunas enzimas involucradas en la metanogénesis. Kamra et al.³⁹ evaluaron el efecto de sustratos de plantas tropicales sobre la producción de metano *in vitro* y encontraron que el extracto de aceite de ajo redujo 64% la producción de CH₄ sin alterar la digestibilidad del alimento, lo cual es consistente con la disminución en la producción de acetato y el aumento en la producción de propionato reportada por Busquet et al.⁶ con este mismo extracto. La utilización *in vivo* del aceite de ajo presenta resultados contradictorios. Klevenhusen et al.⁴² no encontraron efectos con la utilización de dosis altas (500 mg/L), mientras que dosis de 100 y 300 mg/L reportadas por otros autores^{7,9} si presentaron efectos sobre la producción de CH₄.

Análogos estructurales de la coenzima M. La Coenzima M está involucrada en el último paso de la biosíntesis de CH₄ y entre sus análogos estructurales se encuentra el 2-bromoetanosulfonato (BES), 2-cloroetanosulfonato (CES), 2-mercaptoetanosulfonato (MES) y lumazina. Estos compuestos pueden inhibir, por competencia, la reacción de transferencia del grupo metil en la etapa reductiva terminal durante la formación de CH₄ a partir de H₂ y CO₂⁴⁸. Normalmente, estas sustancias pueden inhibir

todos los grupos de metanógenos en una concentración relativamente baja. Ungerfeld et al.⁸³ encontraron que la utilización de <1 mM de BES inhibió la metanogénesis en cultivos con líquido ruminal y que *Metanobrevibacter ruminantium* fue la especie más susceptible.

Inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa. Todas las *Archaea* tienen una membrana celular única que contienen glicerol unido a alcoholes de cadena larga o isoprenoides, estas cadenas contienen un precursor llamado mevalonato que se produce a partir de la reducción del cofactor HMG-CoA. Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa son considerados inhibidores específicos de la metanogénesis al reducir el crecimiento de los metanógenos ruminales por inhibición de la síntesis de mevalonato⁴⁸. Wolin y Miller⁹⁰ demostraron que las estatinas, a saber, mevastatina y lovastatina, inhiben el crecimiento de *Metanobrevibacter* sin afectar el crecimiento de otras bacterias del rumen, ya que sus membranas celulares están constituidas por ésteres de glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Miller y Wolin⁵⁴ y Wolin y Miller⁹⁰ lograron inhibición completa del crecimiento de metanógenos utilizando mevastatina y lovastatina a niveles de 0,004 mg/ml. Faseleh Jahromi et al.¹⁶ reportaron reducción en el crecimiento de metanógenos y en la producción de CH₄ desde un nivel de 0,001 mg/ml de lovastatina. Nováková et al.⁶⁵ encontraron una reducción del 83% en el crecimiento de metanógenos y del 43,9% en la producción de CH₄ en presencia de pravastatina a un nivel de 0,02 mg/ml.

Ácidos grasos de cadena media o larga

Se cree que los ácidos grasos de cadena media y larga inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y bacterias metanogénicas vía absorción y ruptura de las membranas celulares^{19,78}. El ácido láurico, un ácido graso de cadena media, inhibió la metanogénesis *in vitro* un 76%⁵¹. Ungerfeld et al.⁸⁴ encontraron que el ácido hexadecatrienoico, de cadena larga, inhibió la producción *in vitro* de CH₄ en un 97%. Además, la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados puede constituirse en una ruta alternativa para la utilización de H₂ en el rumen⁶⁸.

Conclusión

En el ambiente ruminal, el principal mecanismo para mantener una baja presión de H₂ y no afectar adversamente

la fermentación de los alimentos es la metanogénesis, proceso durante el cual se reduce el CO₂ derivado de la producción de ácido acético y butírico. El CH₄ generado contribuye al aumento del efecto invernadero y reduce la retención de energía en los animales, por tanto, es importante que en zonas ecuatoriales, donde la alimentación de los animales está basada en sustratos con alto contenido de fibra, se evalúen los efectos de diferentes dietas y aditivos que permitan aumentar la eficiencia digestiva y reducir las emisiones de CH₄.

Reducir la intensidad de las emisiones de CH₄ requiere la aplicación integrada de múltiples estrategias que incluyen la utilización de aditivos que inhiban la metanogénesis o mejoren las condiciones de fermentación ruminal y la selección genética de animales más eficientes en la utilización del alimento.

Muchas estrategias dietarias para reducir emisiones de CH₄ son frecuentemente evaluadas *in vitro*, sin embargo cuando testadas *in vivo* no presentan la misma eficacia. Estas diferencias están asociadas a la dilución del fluido ruminal con la solución tampón y a que los animales donadores de inóculo generalmente no consumen el aditivo que se pretende testar. Por tanto, los resultados aportados por métodos *in vitro* deben ser interpretados con cautela.

Experimentos *in vivo* o *in vitro* que evalúen aditivos inhibidores de la metanogénesis deben cuantificar la producción de H₂, debido a que su emisión puede incrementarse cuando la producción de CH₄ disminuye. Este es un factor importante puesto que el H₂ tiene un potencial de calentamiento global equivalente al del CH₄.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias por el apoyo para el desarrollo de la propuesta de investigación “Evaluación *in vitro* e *in vivo* de diversas estrategias nutricionales para mitigar las emisiones de metano y su impacto productivo, reproductivo y económico en ganadería de leche especializada en el norte de Antioquia”, la cual motivo la realización de esta revisión de literatura.

Referencias

1. Alaboudi AR, Jones GA. Effect of acclimation to high nitrate intakes on some rumen fermentation parameters in sheep. *Can J Anim Sci* 1985; 65(4): 841-849.
2. Asanuma N, Iwamoto M, Hino T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. *J Dairy Sci* 1999; 82(4): 780-787.
3. Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, *et al.* A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim Feed Sci Technol* 2008; 145(1): 209-228.
4. Blaxter KL, Clapperton JL. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Brit J Nutr* 1965; 19(01): 511-522.
5. Boone DR, Johnson RL, Liu Y. Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of Km for H₂ or formate uptake. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55(7): 1735-1741.
6. Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Cardozo PW, Kamel C. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J Dairy Sci* 2005a; 88(7): 2508-2516.
7. Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Carro MD, Kamel C. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 2005b; 88(12): 4393-4404.
8. Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 2006; 89(2): 761-771.
9. Chaves AV, He ML, Yang WZ, Hristov AN, McAllister TA, *et al.* Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Can J Anim Sci* 2008; 88(1): 117-122.

10. Chin KJ, Janssen PH. Propionate formation by *Opitutus terrae* in pure culture and in mixed culture with a hydrogenotrophic methanogen and implications for carbon fluxes in anoxic rice paddy soil. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4): 2089-2092.
11. Czerkawski JW. Methane production in ruminants and its significance. *World Rev Nutr Diet* 1969; 11: 240-282.
12. Czerkawski JW. Fate of metabolic hydrogen in the rumen. *Proc Nutr Soc* 1972; 31(02): 141-146.
13. Dawson KA, Rasmussen MA, Allison MJ. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: Hobson PN, Stewart CS (eds). *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. London: Chapman & Hall; 1997. p. 633-660.
14. De Haas Y, Windig JJ, Calus MPL, Dijkstra J, De Haan M, et al. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *J Dairy Sci* 2011; 94(12): 6122-6134.
15. Deppenmeier U, Müller V. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. *Results Probl Cell Differ* 2008; 45: 123-152.
16. Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ho YW, Mohamad R, Goh YM, et al. Lovastatin in *Aspergillus terreus*: Fermented Rice Straw Extracts Interferes with Methane Production and Gene Expression in *Methanobrevibacter smithii*. *BioMed Research International* 2013; [acceso: 27 de enero de 2014]. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/604721>
17. Finlay BJ, Esteban G, Clarke KJ, Williams AG, Embley TM, et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117(2): 157-161.
18. Fonty G, Williams AG, Bonnemoy F, Morvan B, Withers SE, et al. Effect of *Methanobrevibacter* sp MF1 Inoculation on Glycoside Hydrolase and Polysaccharide Depolymerase Activities, Wheat Straw Degradation and Volatile Fatty Acid Concentrations in the Rumen of Gnotobiotically-reared Lambs. *Anaerobe* 1997; 3(6): 383-389.
19. Galbraith H, Miller TB. Physicochemical effects of long chain fatty acids on bacterial cells and their protoplasts. *J App Microbiol* 1973; 36(4): 647-658.
20. Garton GA. The digestion and absorption of lipids in ruminant animals. *World Rev Nutr Diet* 1967; 7: 225-250.
21. Hales KE, Cole NA, MacDonald JC. Effects of corn processing method and dietary inclusion of wet distillers grains with solubles on energy metabolism, carbon– nitrogen balance, and methane emissions of cattle. *J Anim Sci* 2012; 90(9): 3174-3185.
22. Hammond KJ, Burke JL, Koolaard JP, Muetzel S, Pinares-Patiño CS, et al. Effects of feed intake on enteric methane emissions from sheep fed fresh white clover (*Trifolium repens*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) forages. *Anim Feed Sci Technol* 2013; 179 (s 1-4): 121-132.
23. Hammond KJ, Muetzel S, Waghorn GG, Pinares-Patino, CS, Burke JL, et al. The variation in methane emissions from sheep and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. *Proceedings of the 69th Conference of the New Zealand Society of Animal Production*; 2009 June 24-26; Canterbury, New Zealand. *New Zealand Society of Animal Production*; vol. 69, p. 174-178.
24. Hegarty RS, Gerdes R. Hydrogen production and transfer in the rumen. *Rec Adv Anim Nutr* 1998; 12: 37-44.
25. Hino T, Russell JB. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50(6): 1368-1374.
26. Holter JB, Young AJ. Methane prediction in dry and lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 1992; 75(8): 2165-2175.
27. Hubert C, Voordouw G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that

- outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(8): 2644-2652.
28. Hungate RE. The rumen microbial ecosystem. *Annu Rev Ecol Syst* 1975; 6: 39-66.
29. Hungate RE, Smith W, Bauchop T, Yu I, Rabinowitz JC. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *J Bacteriol* 1970; 102(2): 389-397.
30. Hybu Cig Cymru/Meat Promotion Wales. Reducing methane emissions through improved lamb production. Tŷ Rheidol, UK 2011; [acceso: 26 de febrero de 2014]. URL:<http://hccmpw.org.uk/medialibrary/publications/Reducing%20Methane.pdf>
31. Iannotti EL, Kafkewitz D, Wolin MJ, Bryant MP. Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. *J Bacteriol* 1973; 114(3): 1231-1240.
32. IPCC (2007) Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: Solomon S, Quin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, et al. (eds) *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp 212–213.
33. Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Effect of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. *Anim Sci J* 1999; 70(6): 471–478.
34. Janssen PH. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim Feed Sci Technol* 2010; 160(1): 1-22.
35. Janssen PH, Kirs M. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(12): 3619-3625.
36. Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2012; 96(3): 365-375.
37. Johnson DE, Hill TM, Ward GM, Johnson KA, Branine ME, et al. Principle factors varying methane emissions from ruminants and other animals. In: Khalil MAK (ed). *Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change*. NATO ADI Series Vol. 113. Berlin: Springer-Verlag; 1993. p. 199–229.
38. Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 1995; 73(8): 2483-2492.
39. Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In: Soliva CR, Takahashi J, Kreuzer M (eds). *Greenhouse Gases and Animal Agriculture: An Update*. International Congress Series No. 1293. The Netherlands: Elsevier; 2006. p. 156-163.
40. Kappler O, Janssen PH, Kreft, JU, Schink B. Effects of alternative methyl group acceptors on the growth energetics of the O-demethylating anaerobe *Holophaga foetida*. *Microbiology* 1997; 143(4): 1105-1114.
41. Kim BH, Gadd GM. *Bacterial physiology and metabolism*. 1^a ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.
42. Klevenhusen F, Zeitz JO, Duval S, Kreuzer M, Soliva CR. Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Anim Feed Sci Technol* 2011; 166: 356-363.
43. Lana RP, Russell JB, Van Amburgh ME. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J Anim Sci* 1998; 76(8): 2190-2196.
44. Latham MJ, Wolin MJ. Fermentation of cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium ruminantium*. *Appl Environ Microbiol* 1977; 34(3): 297-301.

45. Laube VM, Martin SM. Conversion of Cellulose to Methane and Carbon Dioxide by Triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, *Desulfovibrio sp.*, and *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42(3): 413-420.
46. Leahy SC, Kelly WJ, Altermann E, Ronimus RS, Yeoman CJ, et al. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *Plos One* 2010; 5(1): 1-17
47. Leng RA. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. Report to Department of Climate Change, Commonwealth Government of Australia, Canberra 2008; [acceso: 18 de marzo de 2014]. URL:<http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final%20Modified%20%2017-9-2008.pdf>
48. Liu H, Wang J, Wang A, Chen J. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 89(5): 1333-1340.
49. López MC, Ibáñez C, García-Diego FJ, Javier Moya V, Estellés, F, et al. Determination of methane production from lactating goats fed diets with different starch levels. International Livestock Environment Symposium (ILES IX). International Conference of Agricultural Engineering-CIGR-AgEng 2012; [acceso: 20 de abril de 2014]. URL: http://mobile.cigr.ageng2012.org/images/fotosg/tabla_137_C0842.pdf
50. López S, Valdes C, Newbold CJ, Wallace RJ. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation *in vitro*. *Brit J Nutr* 1999; 81: 59-64.
51. Machmüller A, Soliva CR, Kreuzer M. In vitro ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Can J Anim Sci* 2002; 82(2): 233-239.
52. Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kistner A, Dennison C. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *Brit J Nutr* 1988; 59(2): 301-313.
53. Matsuyama H, Horiguchi K, Takahashi T, Kayaba T, Ishida M, et al. Control of methane production from expiratory gas by ruminal dosing with mechanical stimulating goods in Holstein steer. *Asian-Aus J Anim Sci* 2000; 13: 215-215.
54. Miller TL, Wolin MJ. Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylflutaryl-SCoA reductase inhibitors. *J Dairy Sci* 2001; 84:1445–1448.
55. Mitsumori M, Sun W. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. *Asian-Aus J Anim Sci* 2008; 21(1): 144-154.
56. Moe PW, Tyrrell HF. Methane production in dairy cows. *J Dairy Sci* 1979; 62(10): 1583-1586.
57. Moss AR, Jouany JP, Newbold J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech* 2000; 49(3): 231-254.
58. Müller M. Review Article: The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* 1993; 139(12): 2879-2889.
59. Müller V, Lemker T, Lingl A, Weidner C, Coskun Ü, et al. Bioenergetics of archaea: ATP synthesis under harsh environmental conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2006, 10(2-4): 167-180.
60. Murphy MR, Baldwin RL, Koong LJ. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J Anim Sci* 1982; 55(2): 411-421.
61. Murray K, Rodwell V, Bender D, Botham KM, Weil PA, et al. Harper's Illustrated Biochemistry. 29th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
62. Nagaraja TG, Newbold CJ, Van Nevel CJ, Demeyer DI. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson PN, Stewart CS (eds). *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. London: Blackie Acad and Prof; 1997. p. 523–632.

63. Navarro-Villa A, O'Brien M, López S, Boland TM, O'Kiely P. In vitro rumen methane output of grasses and grass silages differing in fermentation characteristics using the gas-production technique (GPT). *Grass Forage Sci* 2012; 68: 228–244.
64. Newbold CJ, Lassalas B, Jouany JP. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21(4): 230-234.
65. Nováková Z, Blaško J, Hapala I, Šmigáň P. Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitor pravastatin on membrane lipids and membrane associated functions of *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Folia Microbiol* 2010, 55(4): 359-362.
66. Patra AK, Saxena J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J Sci Food Agric* 2011; 91(1): 24-37.
67. Paynter MJB, Hungate RE. Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp. n., isolated from the bovine rumen. *J Bacteriol* 1968; 95(5): 1943-1951.
68. Polan CE, McNeill JJ, Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J Bacteriol* 1964; 88(4): 1056-1064.
69. Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784(12): 1873-1898.
70. Russell JB, Jeraci JL. Effect of carbon monoxide on fermentation of fiber, starch, and amino acids by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(1): 211-217.
71. Sauer FD, Teather RM. Changes in oxidation reduction potentials and volatile fatty acid production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited. *J Dairy Sci* 1987; 70(9):1835-1840.
72. Schäfer G, Engelhard M, Müller V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63(3): 570-620.
73. Schink B. Syntrophic associations in methanogenic degradation. In: Overmann J (ed.). *Molecular Basis of Symbiosis*. Berlin: Springer; 2006. p.: 1-19
74. Schink B, Stams AJM. Syntrophism among prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag; 2006. p. 309-335.
75. Sharp R, Ziemer CJ, Stern MD, Stahl DA. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol Ecol* 1998; 26(1): 71-78.
76. Shibata M, Terada F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Anim Sci J* 2010, 81(1): 2-10.
77. Skillman LC, Evans PN, Naylor GE, Morvan B, Jarvis GN, et al. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 2004; 10(5): 277-285.
78. Soliva CR, Hindrichsen IK, Meile L, Kreuzer M, Machmüller A. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37(1): 35-39.
79. Takahashi J, Johchi N, Fujita H. Inhibitory effects of sulphur compounds, copper and tungsten on nitrate reduction by mixed rumen micro-organisms. *Brit J Nutr* 1989; 61(03): 741-748.
80. Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(8): 579-591.
81. Ungerfeld EM, Kohn RA. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO (eds). *Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of*

- nutrition on gene expression, immunology and stress. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2006. p. 55-85.
82. Ungerfeld EM, Kohn RA, Wallace RJ, Newbold CJ. A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *J Anim Sci* 2007; 85(10): 2556-2563.
83. Ungerfeld EM, Rust SR, Boone DR, Liu Y. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *J Appl Microbiol* 2004; 97(3): 520-526.
84. Ungerfeld EM, Rust SR, Burnett RJ, Yokoyama MT, Wang JK. Effects of two lipids on in vitro ruminal methane production. *Anim Feed Sci Technol* 2005; 119(1): 179-185.
85. Ushida K, Ohashi Y, Tokura M, Miyazaki K, Kojima Y. Sulphate reduction and methanogenesis in the ovine rumen and porcine caecum: a comparison of two microbial ecosystems. *Dtsch Tieraerztl Wochenschr* 1995; 102(4): 154-156.
86. Van Kessel JAS, Russell JB. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol Ecol* 1996; 20(4): 205-210.
87. Vogels GD, Hoppe WF, Stumm CK. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40(3): 608-612.
88. Whitford MF, Teather RM, Forster RJ. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology* 2001; 1: 1-5.
89. Williams AG, Coleman GS. The rumen protozoa. In: Hobson PN, Stewart CS (eds). *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. New York: Springer; 1997. p. 77-139.
90. Wolin MJ, Miller TL. Control of rumen methanogenesis by inhibiting the growth and activity of methanogens with hydroxymethylglutaryl-SCoA inhibitors. *Int Congr Ser* 2006; 1293: 131-137.
91. Zhou MI, Hernandez-Sanabria E. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(20): 6524-6533.
92. Zhou M, Hernández-Sanabria E. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(12): 3776-3786.