UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio del efecto del aceite esencial de orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía sobre la metanogénesis y la actividad fibrolítica del ecosistema ruminal

Tatiana Alejandra Rodríguez Quiroz

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Facultad de Ciencias
Bogotá D.C., Colombia
2014

Estudio del efecto del aceite esencial de orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía sobre la metanogénesis y la actividad fibrolítica del ecosistema ruminal

Tatiana Alejandra Rodríguez Quiroz

Directora:
Olga Lucia Mayorga Mogollón PhD
Investigadora Asociada
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Codirectora:
Sonia Amparo Ospina Ph.D.
Docente Asociada Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:
Ecología Microbiana y mitigación de emisiones de gases efecto invernadero e Impacto Ambiental
Grupo de Investigación:
Grupo de Microbiología y Nutrición del Trópico

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Facultad de Ciencias
Bogotá D.C., Colombia
2014

Dedicatoria

A Dios, la fuerza y energía universal que hace posible todo lo que nuestro corazón, alma y mente puede ver, crear o imaginar

A mi madre, mis hermanas Angela y Patricia, y sobrinos Andrés y Sebastián, que son la esencia y el pilar de lo que soy

A mi padre y abuela Anita que desde el cielo me acompañan y llenan de luz los senderos de mi existencia

…La sabiduría no es conocimiento, es una bonita mezcla de inteligencia y amor. Saber usar ambos atributos a la vez, es haberla encontrado…
Elisabet Rosselló

…¡Comparte tus conocimientos, es una buena manera de ganarse la inmortalidad!

Agradecimientos

.
Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico, técnico, científico y humano de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), y la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

A nivel personal agradezco a mi familia: mi mamá Marina, mis hermanas Angela y Patricia, y mis sobrinos, por su apoyo incondicional.

A mi tutora Olga Lucía Mayorga, por apoyarme constantemente, guiándome y aportando su conocimiento y experiencia en cada paso desarrollado a lo largo de este proceso de maestría y proyecto de tesis.

A la doctora Sonia Ospina, quien ha sido un apoyo tanto en los espacios curriculares durante la maestría, como en el ejercicio de codirección de este trabajo.

A todo el personal de CORPOICA, donde he ido creciendo profesional y personalmente; especialmente al laboratorio de Nutrición Animal, liderado por la doctora Claudia Ariza, quién creyó en mí y me abrió las puertas para dar continuidad a mi proyecto de tesis, a mis compañeros coejecutores de proyecto Edgar Mancipe y Lorena Mestra, al personal del laboratorio en general, quienes siempre están dispuestos a colaborar; a mis amigos, asesores y consejeros: Charlie, Vienvilay y Sonia, quienes siempre me han apoyado tanto a nivel profesional como personal, pero en especial a Erika Angarita y su invaluable colaboración, fundamental y esencial en el desarrollo de este trabajo, por sus aportes tanto técnicos, profesionales y personales basados en su experiencia en este tema, los cuales contribuyeron enormemente. De igual manera, al personal del laboratorio de Genética Molecular Vegetal, a Félix, Gina, John, Paola, Sara y demás integrantes por facilitarme las herramientas, conocimientos, asesoría y apoyo para la ejecución de este trabajo,

A los Jurados Juan E. Carulla, docente de la Facultad en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional y a Martha Lucía Cepeda investigadora de Corpogen por sus criticas constructivas, sugerencias y comentarios enriquecedores en la mejora de este trabajo, y en general a todos los que hicieron este proyecto posible.

¡Muchas gracias!

Resumen

Este estudio evaluó por primera vez el aceite esencial de orégano (AEO) nativo colombiano *Lippia origanoides* Kunth (componente principal timol 70%) como modulador de la estructura de la comunidad de los metanógenos ruminales, la actividad fibrolítica y consecuentemente sobre la metanogenesis ruminal. En primera instancia se evaluó el efecto de la dosis del AEO sobre la producción de metano y DIVMS en fermentaciones *in vitro* utilizando como sustrato *Penisetum cladestinum* con cinco niveles de inclusiòn a 10, 25, 50, 75 y 100 ppm. La cinética de producción de gas total y CH_4 fue seguida a 0, 2, 4, 8,12, 24 y 48 horas. Estas cinéticas se parametrizaron a través del modelo de Gompertz, obteniendo la máxima producción de gas y de metano y las tasas máximas de producción de éstos. Se seleccionó el nivel de inclusión 25 mg/kg de MS de AEO de para el estudio experimental *in vivo*, para el cual fueron empleadas cuatro novillas Holstein en un diseño cross-over simple con tres periodos de 21 días, alimentadas con una dieta basal de *Pennisetum clandestinum*. La cuantificación de las emisiones de CH4 fue realizada a través de la técnica del politunel; los animales fueron alojados en dos carpas para el muestreo de gases cada hora de metano hasta la hora 24, replicado este proceso por tres días. El fluido ruminal se colectó al final de cada periodo para la evaluación de parámetros fermentativos y análisis de las comunidades metanógenas, para el cual fueron usados cebadores específicos para del gen *mcrA* y secuenciadas por pirosecuenciación GS FLX. Las fermentaciones *in vitro* mostraron un efecto altamente significativo (P<.0001) por el nivel de inclusión del AEO. El nivel de 100 ppm presentó una respuesta negativa en los parámetros fermentativos evaluados. La reducción de la tasa máxima de producción CH_4 se observó en los niveles de 25, 50, 100 ppm, reduciendo en 40, 43 y 26 %, respectivamente. En el ensayo *in vivo*, la inclusión de AEO en la dieta no generó efecto sobre los parámetros fermentativos como amonio (P=0,8308), la relación acético;propiónico (P=0,1231), la actividad xilanolítica (P=0,1343) y celulolítica (P=0,6255) y la emisión de CH_4 entérico (P=0.7576). En cuanto al análisis molecular, un total de 83.441 secuencias fueron procesadas, analizadas y asignadas taxonómicamente usando las herramientas Ribosomal Database Project (RDP) y el software QIIME, representadas en 416,3 OTUs sin AEO y 473,0 con AEO, en donde la diversidad estimada por Chao1 fue de 852,7 sin AEO y 984,8 con AEO y la evaluación de la diversidad de especies mediante el índice de Shannon-Wiener (H') fue de 6,59 con AEO y 6,89 sin AEO, sin diferencias significativas en los indicies entre tratamientos y en donde la asignación taxonómica represento mayor frecuencia para el grupo de *Archaeas* o phylum *Euryarchaeota* sin asignar con valores de un 90,92%, seguido de la familia *Methanobacteriaceae* 8,03% y una familia de los *Thermoplasmatales* 1,59%. Como resultado se concluye que la inclusión de AEO a 25 ppm no causó un efecto significativo en el ensayo in vivo, en relación con la respuesta de los parámetros de la fermentación evaluados, así como en las poblaciones de arqueas sin afectar la metanogénesis en el rumen.

Palabras clave: Aceite esencial de orégano, fermentación in vitro, gases efecto invernadero, pirosecuenciación, metanogénesis, producción de gas.

Abstract

This study is the first evaluation about the Colombian native oregano essential oil (OEO) *Lippia origanoides* Kunth (main component thymol 70%) as a rumen modulator of structure of methanogen community, fibrolytic activity and consequently rumen methanogenesis. The first step was performanced by *in vitro* gas production technique (IVGPT) using as substrate Kikuyo (*Penisetum clandestinum*) to evaluate inclusion of five levels (10, 25, 50, 75 and 100 ppm) of EOE on extent of gas production and methane and DM disappearance. The kinetics total gas production and CH_4 was sampled at 0, 2, 4, 8, 12, 24 hours. These kinetics were parameterized by Gompertz model to determinate the rate and extent of gas production and methane production. The doses of AEO 25 mg/kg DM was selected for the *in vivo* experimental study, using four Holteins non-lacting cows under a cross over experimental design during three periods of 21 days and fed with a *Pennisetum clasdestinum* basal diet. The CH_4 emissions were quantifying through the "politunel" technique and where animals were housed for sampling methane each hour up to 24th hour, replicated for three days. The rumen fluid was collected at the end of each period for the assessment and analysis of fermentation parameters and rumen methanogen communities. The rumen methanogen community was analyzed using specific primers from the mcrA gene and sequenced by pyrosequencing GS FLX. In the in vitro assay, the inclusion level showed highly significant differences (P<.0001) between the control and the other inclusion levels. The doses of 100 ppm showed a negative effect on the fermentation parameters evaluated. The rate of methane production was affected by levels 25, 50, 100 ppm, reducing by 40, 43 y 26 %, respectively. In the in vivo assay, the AEO inclusion on basal diet no effect generated on the rumen fermentation parameters such as ammonium (P=0.8308), the ratio acetic acid:propionic acid (P=0.1231), the xylanolytic activity (P=0.1343) and cellulolytic (P=0.6255) and emission enteric CH_4 (P=0.7576). From sequencing analysis were processed a total of 83,441 sequences, followed the cleaning and mapping procedures by using the Ribosomal Database taxonomically Project (RDP) and QIIME software tools, what represented 416.3 without AEO and 473.0 OTUs with AEO. The diversity index estimated by Chao1 was 852.7 without AEO and 984.8 with AEO. The species diversity by Shannon-Wiener index (H') was 6.59 with and 6.89 without AEO, which there was significant differences between treatments. The most represent taxonomic assignments were for the phylum *Euryarchaeota* unassigned values of 90.92%. In terms family assignment was 8.03% *Methanobacteriaceae* family, followed by 1.59% *Thermoplasmatales* family. In conclusion, the inclusion of AEO at 25 mg/kg DM did not caused significant effect on rumen methanogenesis under this experimental condition related to the response of the fermentation parameters, enzymatic activity and structure and diversity of methanogens.

Key words: Gas production, greenhouse gases, in vitro fermentation, methanogenesis, oreganum Essential oil, pyrosequencing

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VIII**

Lista de figuras **3**

Lista de tablas **3**

Lista de Símbolos y abreviaturas **5**

Introducción **7**

1. Revisión de literatura **11**
1.1 El Ecosistema ruminal 11
1.1.1 Condiciones de fermentación ruminal 12
1.1.2 Microorganismos del rumen 14
1.1.2.1. Bacterias 15
1.1.2.2. Hongos 16
1.1.2.3. Protozoarios 17
1.1.2.4. Archaeas metanogénicas 13

1.2 Metanogénesis ruminal 18
1.2.1 Bioquímica de la metanogénesis 18
1.2.2 Estrategias de control de la metanogénesis en el rumen 22

1.3 Aceites esenciales 24
1.3.1 Aceite esencial de orégano (AEO) 27
1.3.2 Modo de acción del AEO sobre la actividad microbiana 28

1.4 Técnicas de evaluación de la degradación de los forrajes y metanogénesis en el rumen 29
1.4.1 Métodos *in vitro* 29
1.4.2 Métodos *in vivo* 32
1.5 Métodos de estudio de ecología microbiana ruminal por técnicas moleculares 33
1.5.1 Metagenómica y pirosecuenciación 35
1.5.2 Evaluación de la diversidad 39

2. Materiales y métodos **42**
2.1 Localización de los experimentos 42
2.2 Material biológico 42

2.3 Experimento 1: Evaluación bajo condiciones *in vitro* del efecto del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides*) sobre la degradación de la fibra y la producción de metano (CH_4) por los microorganismos del rumen. 43
2.3.1 Técnica de producción de gas total in vitro 43
2.3.2 Montaje de la fermentación 43
2.3.3 Diseño del experimento 44
2.3.4. Análisis estadísitico……...41

2.4 Experimento 2: Determinación de la actividad moduladora del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) sobre el ecosistema ruminal y su impacto en las emisiones de metano entérico de bovinos bajo condiciones de trópico alto Colombiano. ……45
2.4.1 Localización del experimento 45
2.4.2 Animales experimentales 45
2.4.3 Dieta 46
2.4.4 Evaluación de las emisiones de metano in vivo usando la técnica del politúnel ….....47
2.4.5 Diseño Experimental y análisis estadísitico 49
2.4.6 Evaluación de la actividad fibrolítica de la comunidad microbiana 49
2.4.7 Evaluación molecular de las poblaciones Metanogénicas 50
2.4.7.1. Extracción y amplificación del ADN ……..…50
2.4.7.2. Pirosecuenciación de amplicones etiquetados para metanógenos totales……..…50
2.4.7.3. Procesamiento y análisis bioinformático de secuencias……...50

3. Resultados 54
3.1 Evaluación bajo condiciones *in vitro* del efecto del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides*) sobre la degradación de la fibra y la producción de CH_4 por los microorganismos del rumen.....56
3.1.1 Dinámica de la producción de gas total, DIVMS y CH_4.....56
3.2 Discusión 60
3.3 Determinación de la actividad moduladora del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) sobre el ecosistema ruminal y su impacto en las emisiones de metano entérico de bovinos bajo condiciones de trópico alto Colombiano 62
3.3.1 Respuesta y condición animal por suplementación con AEO.....62
3.3.2 Parámetros de fermentación ruminal: 64
3.3.3 Estructura y diversidad de la comunidad de metanógenos en el rumen.61
3.4 Discusión 71

4. Conclusiones y recomendaciones.....77
4.1 Conclusiones 77
4.2 Recomendaciones 79

5. Bibliografía 80

Lista de figuras

Pág.
Figura 1-1. Ruta de la metanogénesis. 19
Figura 1-2. Estructura química del carvacrol y del timol . 27
Figura 2-1. Fermentación in vitro 44
Figura 2-2. Novillas de raza Holstein en corrales individuales 46
Figura 2-3. Montaje de la técnica del túnel y animales dentro de la carpa 47
Figura 2-4. Toma de muestra de aire del túnel para cuantificación de metano. 48
Figura 2-5. Diseño de los iniciadores empleados para el análisis de 454 pirosecuenciación. 53
Figura 3-1. Análisis de regresión para los parámetros fermentativos de maxima producción de gas y tasa máxima de producción de gas 57
Figura 3-2. Porcentaje de DIVMS con concentraciones de AEO manejados como niveles de inclusión 58
Figura 3-3. Análisis de regresión para la tasa máxima de producción de CH_4. 59
Figura 3-4. Gel de agarosa con los productos de la amplificación destinados a pirosecuenciación. 65
Figura 3-5. Asignación taxonómica total para las 12 secuencias provenientes de las cuatro novillas de raza Holstein en las fases del experimentos, con los dos tratamientos: con y sin AEO 67
Figura 3-6. Asignaciones taxonómicas dadas a las secuencias de cada animal, evaluados en tres fases: un período de inicio, y lo dos tratamientos: con y sin AEO, mediante la herramienta classifier del RDPipeline 69
Figura 3-7 Asignaciones taxonómicas dadas a 54181 secuencias en total de 12 muestras provenientes de cada animal, evaluados en dos tratamientos: con y sin AEO, mediante el software QIIME 70
Figura 3-8. Análisis de rarefacción para valoración de la cobertura del número de OTU's para .las muestras de contenido ruminal de cuatro novillas raza Holstein 71
Figura 3-9. Índice de similaridad de Jaccard a una distancia de 0,03 para cada uno de los animales en los dos tratmientos (con y sin AEO) 74

Lista de tablas

Pág.
Tabla 1-1 Estrategias de reducción de metano, mecanismo de reducción y consideraciones de uso.. 23
Tabla 1-2. Composición relativa de AEO de *Lippia origanoides* y *Oregano vulgare Hirtum* 28
Tabla 1-3. Resumen del uso de técnicas moleculares en microbiología del rumen 34
Tabla 1-4. Características de las principales plataformas de secuenciación 37
Tabla 2-1. Composición del AEO proveniente de la planta Lippia origanoides 42

Tabla 2-2. Identificación de los animales experimentales, peso inicial, períodos de muestreo y tratamiento usado. 46
Tabla 2-3. Asignación de los iniciadores empleados en la pirosecuenciación de acuerdo a los tratamientos, animales y periodos experimentales.. 53
Tabla 3-1. Parámetros de la ecuación de Gompertz (Y= a * exp (- exp (b – c t))) de la producción de gas total a diferentes niveles inclusión de AEO. 56
Tabla 3-2. Parámetros de la ecuación de Gompertz (Y= a * exp (- exp (b – c t))) de la producción de CH_4 total a diferentes niveles inclusión de AEO ……58
Tabla 3-3. Ganancia de peso y consumo de novillas Holstein durante la adición y no adición del AEO en una dieta basal de kikuyo..... 62
Tabla 3-4. Descripción de los índices de bienestar y climáticos dentro de los túneles 63
Tabla 3-5. Parámetros de fermentación ruminal, emisión de CH_4 y actividad fibrolítica evaluados con bajo dos tratamientos: con y sin AEO incluido en la dieta basal de kikuyo en novillas de raza Holstein…….……64
Tabla 3-6. Descripción de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454…….……..66
Tabla 3-7. Índices de riqueza, diversidad y abundancia relativa: Chao, Shannon-Wiener y Evenness para cada uno de los animales en los diferentes tratamientos bajo la inclusión de AEO en una dieta basal de *Penisetum clandestinum* ……...……72
Tabla 3-8. Índices de la diversidad alfa de archaeas provenientes de fluido ruminal de 4 novillas raza holstein bajo una dieta basal de *Penisetum clandestinum* con la inclusión y no inclusión de AEO al inico y en dos períodos experimentales……...……75

Lista de ecuaciones

Pág.

Ecuación 1-1. Fórmula rarefacción……...……..40
Ecuación 1-2. Fórmula índice de Chao1……...……...……..40
Ecuación 1-3. Fórmula índice de Shannon-Winer……..…….……40
Ecuación 1-4. Fórmula índice de Simpon……..……41
Ecuación 2-1. Fórmula no lineal de Gompertz…..……44

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura/símbolo	Definición
°C	Grados Celsius
µL	Microlitros
A260	Absorbancia medida a 260 nm
A280	Absorbancia medida a 280 nm
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNr	Acido desoxirribonucleico ribosomal
AE	Aceite(s) esencial(es)
AEO	Aceite Esencial de Orégano
ANOVA	Análisis de varianza
APS	Adenosin 5´-fosfosulfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAE	Componentes de aceites esenciales
CR	Contenido ruminal
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
DIVMS	Degradabilidad *in vitro* de la materia seca
dNDP	Deoxinucleosidos difosfatos
dNMP	Deoxinucleosidos monofosfato
dNTP	Deoxinucleosidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FISH	Hibridación fluorescente in situ
GEI	Gases de efecto invernadero
g	Gramos
GLM	Modelo linear general
GS-FLX	Sistema de secuenciación del genoma
h	Horas

Abreviatura/símbolo	Definición
H'	Índice de diversidad de Shannon
Kg	Kilogramos
L	Litro
m	Metros
m^2	Metro cuadrado
m^3	Metro cubico
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Mili molar
ng	Nanogramos
pb	Par(es) de base(s)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
RBP	Base de datos ribosomal
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
s	Segundos
SAS	Sistema de análisis estadístico
SEM	Error estándar de las medias
SSU	Subunidad pequeña ribosomal
Taq	*Thermophilus aquaticus*
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Λ	Índice de diversidad de Simpson

Introducción

En la actualidad, existe una preocupación mundial a causa del fenómeno de calentamiento global por la producción de gases de efecto invernadero (GEI), mientras el dióxido de carbono (CO_2) recibe considerable atención como una posible causa del calentamiento global resultando ser el más abundante y el que actualmente tiene un mayor aporte al incremento del fenómeno, las concentraciones atmosféricas de metano (CH_4), los clorofluorocarbonos y el óxido nitroso (N_2O) han aumentado notablemente en los últimos 150 años contribuyendo al calentamiento global, generando un importante impacto en diversas especies y a espera de efectos más dramáticos en las próximas décadas (Olesen y Bindi 2002). Las tasas de acumulación de CH_4 y CO_2 en la atmósfera han cambiado drásticamente en los últimos años presentando un incremento exponencial (Preston y Leng, 1989), y el aumento de las concentraciones de estos gases provoca el calentamiento de la superficie terrestre y la disminución de la capa de ozono en la estratosfera (Primavesi *et al.* 2004).

El CH_4 como GEI tiene un potencial de calentamiento 25 veces superior al del CO_2 de acuerdo al informe de la FAO (Steinfeld *et al.* 2006), llegando a estimar que entre un 50-60% de las emisiones de CH_4 provienen del sector agrícola, resultando ser la producción pecuaria la principal fuente de CH_4 (Ellis *et al.* 2010). Los rumiantes emiten CH_4 a partir del proceso digestivo anaeróbico desarrollado por la microbiota allí presente y la cual tiene la capacidad de degradar los carbohidratos estructurales y no estructurales de los forrajes, siendo fermentados a ácidos grasos volátiles (AGVs) y posteriormente reducidos a CO_2 formando CH_4 en el proceso y cuya emisión representa pérdida energética alimenticia que no puede ser aprovechada por el animal al ser transformada en gas (McCaughey *et al.* 1997; McCaughey *et al.* 1999; Montenegro y Abarca, 2000). El CH_4 es producido por las *Archaea* metanógenas (Stewart *et al.* 1997; Van Soest, 1994; Weimer, 1998); que constituyen una clase especial en la población ruminal por su papel en la regulación de la fermentación al disminuir el exceso de H_2. La reducción de CO_2 con H_2 es el método primario por el que se produce CH_4 en el rumen y la actividad de los metanógenos depende de factores como la cantidad y tipo de alimento, la manipulación de la fermentación ruminal, así como el procesamiento de los forrajes (Johnson y Johnson, 1995) y las diversas interacciones con otras poblaciones. La manipulación nutricional para suprimir la metanogénesis incluye el uso de forrajes de alta calidad, manejo en la proporción de granos en la dieta, uso de aditivos (como los probióticos), dietas ricas en ácidos grasos insaturados, inclusión de extractos vegetales (como los aceites esenciales) y la modificación de las prácticas de alimentación (Boadi *et al.* 2004; Sharma, 2005; Bonilla y Lemus, 2012); resultando ser las intervenciones en la alimentación las orientadas hacia la optimización del proceso de fermentación ruminal que usualmente generan una mejora de los parámetros productivos y reproductivos, debido entre otros aspectos, a una mejor utilización de la energía y así mismo a la disminución de las emisiones hacia la atmósfera cobrando gran importancia en la protección del medio ambiente (Carmona *et al.* 2004).

Estas condiciones asociadas a la producción de CH_4 entérico han animado a la comunidad científica para encontrar alternativas para mitigar las emisiones de GEI, donde el desarrollo de estrategias para reducir las emisiones de CH_4, resulta clave en la mitigación del impacto ambiental generado por los bovinos, derivando en estudios orientados a la identificación y monitoreo de la diversidad de los metanógenos bajo diferentes condiciones ambientales, constituyendo otra de las líneas de investigación de mayor importancia en la manipulación de la metanogénesis del rumen (Shibata y Terada 2010). Particularmente en Europa, los consumidores y las autoridades de salud buscan disminuir con mayor frecuencia el uso de aditivos químicos como ionóforos y antibióticos, y conducir al uso de productos naturales en la producción animal, de tal manera que estos nuevos métodos posibiliten llegar a la alteración de la fermentación ruminal y así obtener beneficios con los animales por parte de los agricultores; de tal manera que la gran diversidad de metabolitos secundarios producidos en las especies vegetales, se convierte en una alternativa que ofrece enormes oportunidades para este desarrollo, teniendo en cuenta sus componentes bioactivos tales como los aceites esenciales, saponinas y taninos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes que pueden ser explotados en los sistemas productivos de rumiantes para reducir las emisiones de CH_4 (Wallace *et al.* 2002).

En el caso particular de los aceites esenciales (AE) el modo de acción parte de su composición (componentes químicos y grupos funcionales), tales como los terpenoides, compuestos fenólicos y fenoles, con una fuerte actividad antimicrobiana y antioxidante, debido a su naturaleza lipofílica que presenta una alta afinidad por las membranas celulares microbianas (Jouany y Morgavi, 2007) generando una perturbación de estás, alterando la fuerza protónica motriz, el transporte activo de flujo de electrones y la coagulación del contenido celular (Burt, 2004). El empleo de los AE como estrategia para reducir la metanogénesis, se orienta a mejorar el aprovechamiento de nutrientes y consecuentemente reducir la producción de CH_4.

En este estudio se evaluó por primera vez, el efecto del aceite esencial de orégano (AEO) nativo de la ecoregión del alto Patia de Colombia, bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, planteando como hipotesis el efecto de la inclusión del AEO sobre la comunidad microbiana del rumen y en consecuencia su actividad fibrolítica y la metanogénesis ruminal, orientandose ha evaluar su efecto modulador al ser utilizado como aditivo reductor de la metanogénesis al actuar directamente sobre las archaeas metanógenicas, generando un posible efecto indirecto en las rutas metabolicas y así mismo que su acción no afecte negativamente la degradabilidad del sustrato dentro del ecosistema ruminal. Teniendo en cuenta estas hipótesis, como primera etapa experimental a partir de fermentaciones *in vitro* empleando como sustrato la gramínea *Pennisetum clandestinum*, se evaluó el efecto del AEO a diferentes niveles de inclusión sobre la degradabilidad de la materia seca (DIVMS), la dinámica de la producción de gas total y CH_4, seleccionando un nivel de inclusión que posteriormente fue aplicado en la segunda etapa del trabajo a nivel *in vivo,* donde se evaluó el AEO a un nivel de inclusión de 25mg/Kg de MS de consumo de dieta basal de *Pennisetum clandestinum* y suplemento, en vacas Holstein en la Sabana de Bogotá y su efecto sobre la actividad fibrolitica y parámetros fermentativos

ruminales, junto con el análisis molecular de las poblaciones de archaeas, a partir de la información suministrada por la pirosecuenciación usando la plataforma GS-FLX 454 Titanium System (454 Life Sciences) de amplímeros del gen *metil coenzima M reductasa* (*mrcA*), donde se evaluó la diversidad y la estructura de la comunidad metanogénica, estimada a través de índices de diversidad. Así, este trabajo busca al incluir un modulador del ecosistema ruminal en la dieta de animales consiumiendo forrajes en el trópico alto colombiano, contribuir al conocimiento del comportamiento y estructura de las poblaciones metanogénicas del ecosistema ruminal haciendo de la biodiversidad en aceites esenciales de plantas nativas, y como aporte al enfoque actual en los sistemas de producción animal sostenible.

1. Revisión de literatura

1.1 El Ecosistema ruminal

Los rumiantes como ovinos, caprinos y bovinos poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, así como otros carbohidratos no estructurales existentes en la planta, en alimentos de alta calidad nutritiva como la carne y la leche (Carmona *et al.* 2005); por acción sinergica de los diferentes grupos de microorganismos del rumen. El resultado neto de estas reacciones que tienen lugar en el rumen es responsable de la bioconversión de alimentación en forma tal que es utilizable por el animal como fuente de energía (ácidos grasos volátiles de cadena corta y proteína microbial) (Kamra, 2005).

Los rumiantes poseen un estómago dividido en cuatro compartimientos: tres preestómagos: el retículo, el rumen y el omaso, y un cuarto compartimento, el abomaso, que es el estómago glandular. El **retículo** y el **rumen** habitualmente son denominados retículo-rumen, debido a su estrecha relación física y funcional (Hofmann, 1988). El rumen, es el más grande de los preestómagos, ocupando tres cuartas partes de la cavidad abdominal, el cual posee cuatro compartimentos llamados sacos, separados por fuertes pilares musculares, responsables de las contracciones ruminales. El contenido ruminal no forma una mezcla homogénea, ya que está estratificado de acuerdo a la diferente densidad de sus componentes (Cunningham, 1994). En la zona dorsal hay una capa gaseosa, fundamentalmente con CH_4 y CO_2 producidos durante la fermentación. En el estrato inferior adyacente, está la capa sólida, donde se ubica el forraje recientemente consumido y fragmentado por la masticación ingestiva resultando en partículas de forraje entremezcladas con los gases donde hay una alta concentración de microorganismos que degradan las partículas de alimento, y en la zona ventral se encuentra la capa líquida, con partículas de tamaño pequeño en suspensión que pasarán al omaso. (Van Soest, 1994).

La tasa de pasaje del contenido ruminal varia de acuerdo a la dieta, donde el tiempo medio de retención en el retículo-rumen varía de 10 a 24 horas para el agua y los elementos solubles (incluyendo los microorganismos), mientras que aquellos insolubles de alta o baja digestibilidad poseen una vida media aproximada de 30 y 50 hs respectivamente (Relling y Mattioli, 2003), donde el mantenimiento de la actividad necesita de una gran movilidad de sus paredes en la que se produzca una buena mezcla de contenido, facilitando la eliminación de los productos de fermentación (gases), y para ello desarrolla unos movimientos secuenciales que se clasifican en dos tipos: primarios o de mezclado y secundarios o de eructación (Van Soest, 1994), mientras que los AGVs

son retirados por absorción a través de las paredes del esta cavidad intestinal (Relling y Mattioli, 2003).

1.1.1 Condiciones de fermentación ruminal

El rumiante mantiene a nivel retículo-ruminal las condiciones ideales para el crecimiento y multiplicación de los microorganismos, convirtiéndose en un "gigantesco medio de cultivo líquido" (Relling y Mattioli, 2003), donde la digestión fermentativa depende del normal desarrollo de la microbiota y de su acción sinérgica, que conduce a un proceso de transformación por la accion enzimática de un amplio rango de hidrolasas polímeros constituyentes del material vegetal hasta sus monómeros constituyentes (Leonowicz *et al.*1999).

La **actividad fibrolítica**, esta dada por las enzimas producidas por los microorganismos, como parte de la acción para mejorar la degradabilidad de sustratos lignocelulósicos. Las enzimas necesarias para hacer esta degradación se pueden dividir principalmente en: las celulasas (Endoglucanasas, Exoglucanasas, β-glucosidasa) (Bhat y Hazlewood, 2001) y hemicelulasas (β-1,4-endoxilanasa, β-xilosidasa, α-L-arabinofuranosidasa, α-glucuronidasa, acetil xilan esterasa y ácido fenólico esterasa (ácido ferúlico y p-cumarico)) (Beg *et al.* 2001).

Debe tenerse en cuenta que una misma especie microbiana puede cumplir más de una función metabólica, y los microorganismos al actuar en un sistema cooperativo dentro de un complejo ecosistema, sobresale simplemente la acción de una especie como productora de una actividad, pero ésta depende de las condiciones que establecen en conjunto toda la biomasa, y cuyas condiciones ideales incluyen:

- **Aporte de nutrientes:** la nutrición del rumiante depende de la nutrición de su microbiota ruminal, que degrada parcial o totalmente los componentes de la dieta, por lo cual se puede entender que en realidad se está alimentando al rumen para que luego éste alimente al rumiante. (Relling y Mattioli, 2003).

- **Anaerobiosis:** Las condiciones anaerobias del tracto gastro intestinal del rumiante, permiten el desarrollo del metabolismo anaerobio de los microorganismos y de la relación simbiótica con el hospedero. La cantidad de energía liberada por la reacción de transferencia de electrones depende del aceptor final de electrones, que este caso es un compuesto orgánico. Las condiciones anaeróbicas en el rumen son mantenidas por los gases generados durante la fermentación, como el CO_2, CH_4 y trazas de hidrógeno. Algunos oxígenos son atrapados en el alimento consumido por el animal y son utilizados por los facultativos anaerobios presentes en el rumen y por lo tanto una condición anaeróbica perfecta se genera y se mantiene.; en consecuencia, sólo los microorganismos que son capaces de tolerar tal potencial redox bajo (-350 MV) son capaces de sobrevivir en el rumen y el resto se eliminan del sistema. Así mismo, una alta

capacidad de amortiguación y de presión osmótica también limita el crecimiento microorganismos invasores, incluso algunos de los microorganismos ruminales producen compuestos antimicrobianos que limitan el crecimiento de otros que se puedan presentar en el ecosistema (Martínez, 2009)

- **pH:** La flora microbiana del rumen se desarrolla en un rango de pH de 6.0 a 6.9, (aunque puede alcanzar puntualmente valores cercanos a 5 con dietas basadas en carbohidratos de degradación rápida), sin embargo, un pH extremo favorecería el desarrollo de otros microorganismos que alterarian el patrón metabólico del rumen. (Relling y Mattioli, 2003). El mantenimiento del pH es posible gracias a la absorción de AGVs a través de las paredes del rumen y a la amortiguación de la acidez por parte de la saliva, actuando como tampón, debido a que posee fosfatos y bicarbonatos en su composición (Czerkawski, 1986).

- **Presión osmótica:** El contenido ruminal mantiene una presión osmótica semejante a la tisular (alrededor de 300 miliosmoles/litro), para evitar pérdidas desmedidas de agua desde el líquido interticial hacia el rumen o viceversa. Usualmente la presión osmótica se mantiene en 280 mOsm/l incrementándose por la mayor producción de AGVs (Relling y Mattioli, 2003).

- **Temperatura:** Producto de las reacciones químicas dentro del rumen y de la regulación homeotérmica del rumiante, la temperatura ruminal se mantiene entre 38 y 42 °C.

- **Acceso del microorganismo al alimento:** El sustrato estará disponible para el microorganismo cuando se incorpore al medio líquido, siendo los componentes solubles del alimento los primeros en estar disponibles y ser atacados por los microorganismos, mientras que los componentes insolubles deberán ser triturados hasta tener un tamaño lo suficientemente pequeño como para humectarse e incorporarse al medio líquido ruminal, permitiendo que los microorganismos de la fase líquida del contenido ruminal tengan acceso a estos sustratos (Relling y Mattioli, 2003).

- **Eliminación de los productos**: Un bovino produce diariamente cientos de litros de gas (principalmente CO_2 y CH_4 y en pequeñas cantidades: N_2, H_2S, H_2 y O_2) van aumentando hasta ser eliminados por el orificio retículo ruminal y del cardias, mediante las contracciones ruminales, expulsándose a través de las vías respiratorias (Martínez, 2009), mientras que la fracción de la dieta que no pudo ser digerida debe continuar su tránsito por el aparato digestivo (Relling y Mattioli, 2003).

En el caso de los AGVs, siendo los principales el acetato, el propionato y el butirato, los cuales representan más del 95% de la producción total de AGVs (Bannink *et al.* 2006), son una importante fuente de energía metabolizable para los rumiantes (Bergman, 1990) entre un 40 y 70% de la ingesta de energía digestible (France y Dijkstra, 2005). El exceso de poder reductor generado durante la conversión de las hexosas a acetato o butirato se

utiliza en parte por el propionato, pero principalmente por la conversión a CH_4 (Moss *et al.* 2000), por lo tanto proporciones de acetato, butirato y propionato determinan la cantidad de H_2 disponible en el rumen para su utilización por los metanógenos (Aklilu *et al.* 2011), de tal manera que los AGVs e H+ deben ser retirados del rumen, de otro modo su acumulación excesiva aumentaría la presión osmótica y disminuiría el pH a valores nocivos, siendo retirados los AGVs por absorción de las paredes ruminales (Relling y Mattioli, 2003).

Estas condiciones, proporcionan al diversificado ecosistema microbiano el medio adecuado para desarrollar y mantener sus capacidades fisicoquímicas que transforman el alimento en otros compuestos. Las interrelaciones entre y dentro de los distintos grupos contribuyen a su estabilidad y adaptación ante eventuales cambios ambientales o alimentarios (Martinez, 2009).

1.1.2 Microorganismos del rumen

Las redes tróficas del rumen están integradas por bacterias (más de 200 especies, con una concentración media de 10^{10} bacterias/mL), arqueas Metanogénicas, protozoos (más de 20 especies, con cifras de 10^6 protozoos/mL) y hongos (cuya densidad alcanza las 10^4 zoosporas/ mL) (Mackie *et al.* 2000). Las interrelaciones entre y dentro de los distintos grupos contribuyen a su estabilidad y adaptación ante eventuales cambios ambientales o alimentarios.

Esta comunidad microbiana al ser tan extremadamente diversa, la mayoría de microorganismos que la habitan aún no han sido cultivados, sin embargo, con el uso de métodos de biología molecular, por ejemplo se alcanza a estimar para las bacterias que existen por lo menos entre 300 y 400 filotipos (Edwards *et al.* 2004; Larue *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006).

1.1.2.1. Bacterias

Las bacterias son la población predominante, constituyendo un 50-60% de la masa microbiana del rumen (Stewart *et al.,* 1997) las cuales en mayoria son anaerobias estrictas, cuyos requerimientos de crecimientos son un entorno con un bajo potencial redox, un pH entre 6,0 y 6,9 y una temperatura de 39ºC. Las bacterias pueden tolerar un nivel considerablemente mayor de ácidos orgánicos, sin afectar negativamente su metabolismo. La mayoría de las bacterias son Gram-negativas, y el número de bacterias Gram-positivas tiende a aumentar con el aumento de dietas con alta energía en la ración (Kamra, 2005).

Una de las formas más extendidas de clasificar las bacterias del rumen se basa en el sustrato principal que utilizan (Yokohama y Johnson, 1988). Tajima *et al.* 1999 y Tajima *et al.* 2001 describieron 32 géneros y 63 especies de bacterias en el rumen, con morfología

de cocos y bacilos, pero ampliamente variables en cuanto a los sustratos que degradan. De tal manera que se han clasificado de acuerdo a esta característica metabólica en: pectinolíticas, lipolíticas, proteolíticas, utilizadoras de ácidos orgánicos como lactato, degradadoras de carbohidratos no estructurales (almidón y azúcares) y de carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa (Van Soest, 1994).

La actividad de las bacterias celulolíticas, viene dada por un complejo enzimático extracelular con funciones específicas para la degradación de celulosa (Yokohama y Johnson, 1988). Las especies *Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* han sido las bacterias celulolíticas más conocidas en el rumen por su capacidad para crecer en condiciones *in vitro* (Weimer, 1998; Russell y Rychlik, 2001). Otras especies celulolíticas como *Bacteroides succinogenes, Butyrivibrio fibrosolvens, Eubacterium cellulosolvens y Clostridium lochheadii* han sido también ampliamente reportadas y estudiadas (Fondevilla y Dehority 1996). En cuanto a las bacterias hemicelulolíticas aisladas del rumen, se encuentran *Butyrivibrio fibrisolvens, Bacteroides ruminicola y Ruminococcus sp*., se reconocen por que degradan y utilizan con eficiencia la hemicelulosa. Estas bacterias, generan como productos de su metabolismo formato, acetato, butirato, succinato, lactato, H_2 y CO_2 (Stewart y Bryant, 1988).

Estos productos metabólicos bacterianos, pueden ser utilizados como fuente de energía por otras especies (sintropia); por ejemplo, el succinato por la acción de por bacterias como *Selenomonas y Megasphaera* es convertido a propionato y $CO_{2,}$, y este último junto con el H_2 es reducido a CH_4 por las *Archaea*s. (Tajima *et al.* 2001). Así, se eliminan del medio ruminal algunos productos que de acumularse en exceso podrían inhibir la fermentación (Ørskov y Ryle, 1990).

El almidón, es degradado por las bacterias amilolíticas mediante la acción de las alfa amilasas extracelulares, que rompen enlaces **α**-1-4 de las cadenas (Yokohama y Johnson, 1988), sintetizan proteínas a partir de aminoácidos y NH_3 (Hoover, 1986). Estas bacterias son en general menos sensibles a los cambios del pH, manteniendo su actividad degradativa en un amplio intervalo (5,0-7,0) (Mould y Orskov, 1983) y también pueden fermentar azúcares sencillos y carbohidratos de bajo peso molecular llegando a producir mayor cantidad de ácido propiónico que las celulolíticas (Hungate, 1966).

1.1.2.2. Hongos

Los hongos anaerobios ruminales (HAR) (10^3-10^5 zoosporas/mL) pertenecen al dominio *Eukarya* y hacen parte importante del ecosistema cumpliendo diversas funciones metabólicas e incluso físicas. Son estrictamente anaerobios y poseen un complejo sistema enzimático que les permite utilizar todos los polisacáridos estructurales (Fonty y Joblin, 1991), y al ser reconocidos como los primeros colonizadores de los tejidos vegetales, gracias a su tamaño, estructuras morfológicas y actividad enzimática celulolítica y hemicelulolítica, estas enzimas principalmente extracelulares, exhiben una actividad máxima sobre amplios rangos de pH, que rompen activamente la fibra, utilizando

las lesiones o escoriaciones superficiales del material vegetal para acceder a éste. (Akin *et al.* 1990).

Clasificados por sus características morfológicas del talo (monocentricos y policéntricos), al tipo de rizoide (filamentoso o bulboso), número de flagelos por zooesporas (Barr, 1995) y métodos moleculares basados en regiones intergénicas ITS1 del 18S rARN (Brookman, *et al.* 2000). Los HAR han sido clasificados en la clase Chytridiomycetes, orden Neocallimastigales (Li *et al.* 1992) y la familia Neocallimasticaceae (Li *et al.*1993). Los hongos del rumen son clasificados taxonómicamente por Barr (1988) y Barr *et al.* (1989) en tres géneros que poseen talo monocéntrico: *Neocallimastix, Piromyces* y *Caecomyces*; los otros tipos de hongo son de talo policéntrico: *Orpinomyces, Anaeromyces* y *Ruminomyces.* Ozkose *et al.* (2001), reportaron un nuevo género de hongos denominado *Cyllamyces*.

1.1.2.3. Protozoarios

Pese a que el número de protozoos en el rumen es menor que el de las bacterias (en torno a 10^5-10^6/ mL), su tamaño es mucho mayor que el de estas (entre 15 y 300 micras) y según algunos autores (Orpin, 1984; Jouany, 1996) pueden representar hasta el 40% del N microbiano total, y proporcionar el 60% de los productos de fermentación microbiana, siendo responsables del 25% de la actividad celulolítica en el rumen.

Los protozoos ruminales son anaerobios estrictos y pertenecen a varios grupos que comúnmente han sido divididos en dos: holotricos y entodiniomorfos. Los holotricos tienen la superficie del cuerpo cubierta de cilios y su forma es ovalada o redondeada; son móviles y utilizan carbohidratos no estructurales, fundamentalmente solubles. Estos protozoos están representados por 15 diferentes géneros en el rumen de animales diferentes, entre estos géneros están *Isotricha, Dasytricha, Buetschlia* y *Charonina*, que son algunos de los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el rumen (Dehority, 1986; Eloff y van Hoven,1980).

Los entodiniomorfos son más complejos en cuanto a su morfología, y también más específicos en sus requerimientos nutritivos. Pueden utilizar almidón (almacenándolo en ocasiones en forma de vacuolas), celulosa, hemicelulosa, pectina y azúcares solubles, dependiendo de los grupos (Van Soest, 1994), produciendo AGVs y H_2, que será utilizado por las arqueas Metanogénicas adheridas a su superficie para producir CH_4 (Van Soest, 1994). También depredan bacterias e incluso otros protozoos; esto unido a su secuestro en la masa sólida de la digesta, hace que disminuyan la eficiencia de síntesis microbiana en el rumen y provoquen un reciclado de N entre las mezclas bacteriana, protozoaria y de N amoniacal (Viera, 1986; Koenig *et al.* 2000).

Los protozoos se alimentan de materia orgánica, especialmente las bacterias, y es en las vacuolas digestivas donde la hidrólisis y la fermentación tienen lugar; y donde los principales AGVs producidos son el acetato y butirato (Williams y Coleman, 1992; Hillman

et al. 1995). Se ha reportado que un solo protozoario puede fagocitar hasta 10^4 bacterias por hora. Estas estimaciones indican que la prelación de los protozoarios puede renovar toda la biomasa bacteriana en el rumen con alta densidad de protozoos (10^5 a 10^6/mL) esto explica por qué la concentración de la biomasa bacteriana se eleva en animales libres de protozoarios o defaunados (Ushida *et al.* 1997; Wang, *et al.* 2007) dando lugar a importantes cambios en la población microbiana ruminal (Williams y Coleman, 1992).

La población de protozoarios en el rumen, no solo afecta la población bacteriana, también altera drásticamente la comunidad de *Archaeas* (Morgavi *et al.* 2006), ya que ha sido demostrada la existencia de una relación ecto y endosimbiótica entre ellos; sin embargo, no existe mucha información acerca del número de células de *Archaeas* asociadas a las especies de protozooarios basándose en técnicas de conteo, dado que la mayoría de trabajos reportan cambios en la población de metanógenos, pero enfocandose en la cantidad de CH_4 producido, presencia de H_2 y haciendo uso de metodologías basadas en análisis moleculares (Janssen y Kirs, 2008).

1.1.2.4. Archaeas metanogénicas

Dentro de este dominio Archaea, los metanógenos estan clasificados en el filo Euryarchaeota, en los órdenes Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanococcales y Methanopyrales (Joblin, 2005). Aunque en los diferentes hábitats anaeróbios se han identificado alrededor de 70 especies de microorganismos metanogénicos pertenecientes a 21 géneros, sólo 7 especies han sido aisladas del rumen (Jarvis *et al.* 2000, Tajima *et al.* 2001; Whitford *et al.* 2001). Debido a sus características distintivas, resulta ser un desafío el aislamiento y cultivo de los metanógenos ruminales a nivel de laboratorio; desde los primeros estudios sistemáticos en la década de 1950 en el laboratorio de Barker (Stadtman y Barker, 1951), sólo éstas 7 especies han sido aisladas y cultivadas con éxito a partir del rumen: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanomicrobium móvil* y *Methanosarcina barkeri* (Jarvis *et al.* 2000; Miller *et al.* 1986; Oppermann *et al.* 1957;. Paynter y Hungate, 1968).

Los metanógenos están presentes en el rumen en grandes cantidades, siendo abundantes en el retículo-rumen de los rumiantes, con una estimación de las poblaciones que va desde 10^7 hasta 10^9/g de contenido ruminal en los rumiantes alimentados con concentrado y hasta 10^9 a 10^{10}/g en rumiantes alimentados con pasto (Joblin, 2005), dependiendo así del tipo de dieta dada a los animales. Los metanógenos, juegan un papel en el rumen vital en la captación de hidrógeno molecular generado durante la fermentación en el rumen, con lo cual, la fermentación ruminal es un proceso continuo, pero lo cual lleva a una pérdida significativa de la energía bruta consumida por los animales (Kamra, 2005).

Los metanógenos se distinguen de otros microorganismos por sus componentes de pared celular y lípidos de membrana, así como la secuencia de genes del 16S rRNA y enzimas clave implicadas en la Metanogénesis. Las paredes celulares de los metanógenos se componen de pseudomureina y proteínas en la capa superficial y la ausencia de peptidoglicano, que es un componente común de las paredes celulares bacterianas. En el caso de los lípidos de membrana, se encuentran enlazados al glicerol con las cadenas de alquilos por el fitano o bifitano. Por último, los metanógenos poseen cofactores y coenzimas específicas, tales como F_{420}, Metanopterina y la coenzima M, enzimas involucradas en la Metanogénesis (Baker, 1999; De Rosa y Gambacorta, 1988; Jones *et al.* 1987; Kletzin, 2007; Woese *et al.* 1990). La coenzima F_{420}, es un cofactor necesario para enzimas tales como la hidrogenasa y la formato deshidrogenasa, que ha recibido este nombre debido a su absorbancia a 420 nm, lo que permite fluorescencia azul-verde a 470 nm (Ashby *et al.* 2001); la coenzima M o ácido 2-mercaptoetanosulfónico, es producida por los metanógenos, tales como *Methanobacterium* (Rouviere y Wolfe, 1988) y metilada para producir CH_4 (Hobson y Stewart, 1997) .

1.2. Metanogénesis ruminal

1.2.1. Bioquímica de la metanogénesis

McCaughey *et al.* (1999), reportan que el 87% de la producción de CH_4 se da en el rumen, y 13% en el tracto digestivo posterior. De este último, aproximadamente el 89% es absorbido hacia la sangre y expirado a través de los pulmones. Esto indica que cerca del 98% del total de CH_4 producido por los rumiantes puede ser expirado a través de la boca y los orificios nasales. Se considera que en sistemas de producción de alta tecnificación la producción anual de CH_4 en animales adultos está entre 60 y 126 kg (Johnson y Johnson, 1995) y que la producción de CH_4 en los bovinos normalmente representa entre 5.5-6.5% del total de energía potencial consumida en la dieta (Montenegro y Abarca, 2000).

El CH_4 entérico representa una pérdida de energía productiva típicamente entre el 2 y 12% de la ingesta de energía bruta en rumiantes según el nivel de consumo de alimento y la composición de la dieta (Johnson y Johnson, 1995; Boadi *et al.* 2004). Johnson y Johnson, en 1995 indicaron que los dos principales factores responsables de las variaciones en la producción de CH_4 son: la cantidad de carbohidratos fermentados en el retículo-rumen, lo cual implica diversas interacciones dieta-animal, que afectan el balance entre las tasas de fermentación de estos carbohidratos y la tasa de pasaje. El otro mecanismo es la relación de AGVs producidos, la cual regula la producción de H_2 y la subsecuente producción de CH_4 (Carmona *et al.* 2005).

Se han identificado una serie de cofactores y coenzimas únicas para las *Archeas*, que participan en las rutas metabólicas de reducción de CO_2 e H_2 a CH_4 (Rouviere, 1988). Los co-factores metanofurano (MFR), Tetrahidro Metanopterina (H_4MPT), 7-mercapto-heptanoyltreonina (HS-HTP) y $Factor_{430}$, fijan y movilizan el carbono a través de la ruta de

reducción hasta la formación del grupo metil (CH_3). Las coenzimas M, B y la metil reductasa (MCR) participan como precursores del CH_4 en reacciones redox de metil a CH_4. La coenzima F_{420} está involucrada con la transferencia de electrones y producción de energía. Los pasos donde intervienen estas coenzimas se caracterizan por liberar la mayor cantidad de energía requerida por los metanógenos (Thauer 1998) (Ver figura 1-1)

La Metanogénesis es un ciclo que inicia con la reducción del carbono del CO_2 con la coenzima CH_4furano (MFR, 1° reacción), para generar el complejo formil-MFR que es el primer producto estable en la fijación del CO_2. El grupo formil transfiere un carbono al tetrahidroMetanopterina (H_4MPT) en una 2° reacción. El grupo formil es convertido posteriormente en un grupo metenil por la enzima 5,10 metenil-tetrahidrometanopterina ciclohidrolasa (3° reacción), este sustrato se reduce por la coenzima $Factor_{430}$ que dona electrones para la reducción de los dobles enlaces del grupo metenil, formando un grupo metileno en una reacción catalizada por la enzima metileno-tetrahidroMetanopterina: coenzima F_{430} oxidorreductasa (4° reacción). Este sustrato se reduce dos veces a metil-H_4MPT (5° y 6° reacción). Finalmente, el grupo metil de este compuesto se transfiere a la complejo de la coenzima MCR (metilreductasa), resultando en la activación de la síntesis de formil CH_4furano y se completa el ciclo, hasta la reducción final de CH_4, al mismo tiempo que activa el sistema para la síntesis del formil-CH_4-furano (Thauer 1998).

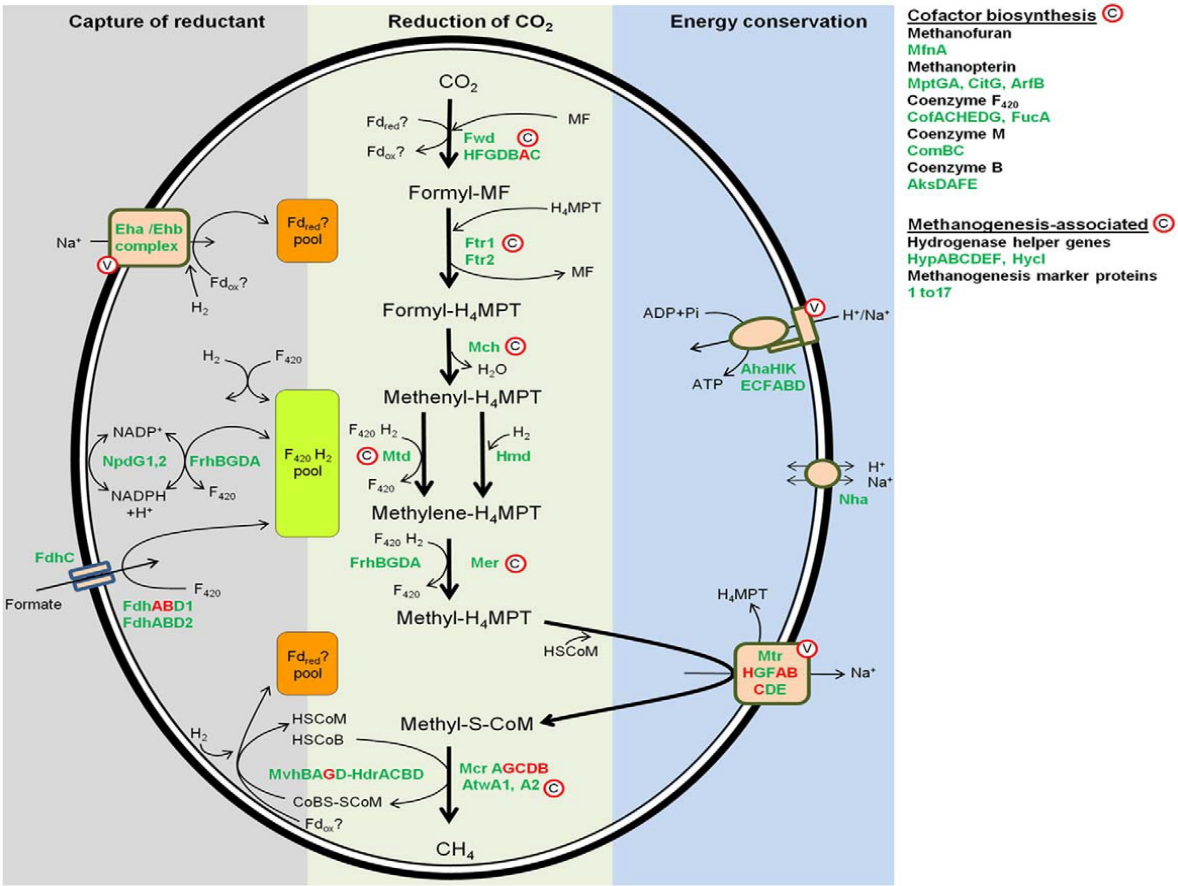


Figura 1-1 Ruta de la metanogénesis: Basado en el esquema de Thauer *et al.* 2008, El diagrama se muestra sin citocromos, y se divide en tres partes para mostrar la captura del agente reductor, la reducción del CO_2, y la conservación de energía en el paso de la metiltransferasa. Se indican con flechas gruesas las principales reacciones y con verde las enzimas que catalizan cada paso. (Leahy *et al.* 2010)

Buriánková *et al.* en el 2013 hace referencia a la expresión de la enzima *Mcr* por parte de las archaeas metanogénicas. Este complejo enzimático se hace un herramienta sustentable para la detección específica de metanógenos. La Metil coenzima M reductasa (mcr) constituye alrededor del 5-12% de la proteina celular de los metanogenos y ha sido dividida dentro de tres componentes A, C, y un pequeño cofactor B. El componente C se cree que es el sitio para la metil reducción y esta compuesto de tres subunidades; α, β y γ que codifican para los genes *mcrA, mcrB* y *mcrG* respectivamente (Earl, *et al.* 2003). Los genomas de todas las arqueas metanogénicas codifican al menos una copia del operón *mcrA* (Hallam, *et al.* 2003). El gen que codifica para *mcr* ha sido objetivo de muchos análisis moleculares en estudios de ecología de metanogenos (Earl, *et al.* 2003; Ramakrishnan, *et al.* 2001). El operon *mcr* existe en dos formas, el gen *mcrA* y *mrtA*. El gen *mcrA* se cree que estar presente en todos los metanógenos, mientras que el gen *mrtA* sólo se ha demostrado en los miembros de los órdenes Methanobacteriales y Methanococcales (Luton, *et al.* 2003)

Otro aspecto relevante, es la presencia o ausencia de citocromos. Los metanógenos que poseen citocromos, específicamente del orden de los Methanosarcinales, tienen mayores tasas de crecimiento, de hasta 7 gramos/mol de CH_4 con un tiempo de duplicación celular de aproximadamente 10 horas y requieren una elevada concentración de H_2 (presiones parciales por encima de 10Pa) pero solo pueden utilizar como sustratos el CO_2, H_2, acetato, CH_4 y metilaminas, haciéndolos incapaces de utilizar el formato para producir CH_4. Por otra parte, los metanógenos del órden de los Methanococcales, Methanobacteriales y Methanomicrobiales, que carecen de estos citocromos, pueden utilizar todos los sustratos mencionados (dependiendo la especie), la concentración de H_2 disponible para su metabolismo está entre 1 y 10Pa pero sus tasa de crecimiento no alcanza los 3 gramos/mol de CH_4 y el tiempo de duplicación celular es mucho menor llegando hasta 1 hora como máximo (Thauer, 2008). A pesar de la dificultad que presenta el aislamiento y cultivo de metanógenos, la bioquímica de la metanogénesis ha sido ampliamente descrita desde los años 30. Sin embargo aún se requieren avances en el estudio de las poblaciones metanogénicas y su metabolismo en ecosistemas complejos como el rumen.

En el rumen, se puede encontrar que la principal diferencia entre la producción de CH_4 frente a otros sistemas anaerobios, es que en los rumiantes el tiempo de retención de los sustratos no permite el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento como los acetógenos productores de H_2, que oxidan sustratos como etanol, butirato o propionato y

disponen de electrones por reducción de H+ a H_2, y metanógenos acetotróficos, capaces de descarboxilar acetato a CH_4 y CO_2, por tanto, los ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato, no se utilizan como sustrato para la metanogénesis ruminal, pero son absorbidos como nutrientes por el animal (Zinder 1992; Morgavi *et al.* 2005). Por lo tanto, la relación ácido acético:ácido propiónico es el aspecto de mayor impacto en la metanogénesis. Si esta relación llega a 0.5, la pérdida energética puede ser de 0%; pero si todos los carbohidratos fuesen fermentados a ácido acético y no se produjera propiónico las pérdidas energéticas podrían llegar a ser del 33%. La relación acético:propiónico puede variar entre 0.9 a 4, por lo tanto las pérdidas por CH_4 varían ampliamente (Johnson y Johnson, 1995).

Moss *et al.* 2000 señalan que la estequiometría de las principales rutas de fermentación se resumen así:

Reacciones productoras de H_2:

$$\textbf{Glucosa} \rightarrow \textbf{2 piruvato} + 4H_2$$
$$\textbf{Piruvato} + H_2O \rightarrow \textbf{Acetato } (C_2) + CO_2 + 2H$$

Reacciones que utilizan de H_2:

$$\textbf{Piruvato} + 4H \rightarrow \textbf{Propionato } (C_3) + H_2O$$
$$2C_2 + 4H \rightarrow \textbf{Butirato } (C_4) + 2H_2O$$
$$CO_2 + 8H \rightarrow CH_4\ (CH_4) + 2H_2O$$

Las archeas metanogénicas del rumen utilizan el hidrogeno molecular para reducir el CO_2 y producir CH_4, las bacterias sulfato reductoras lo usan para reducir sulfatos y producir sulfuros y las bacterias acetogenicas reducen CO_2 y acetato (Breznak *et al.* 1988; Brauman *et al.* 1992; Dore *et al.* 1995; Morvan *et al.* 1996). El efecto de la actividad de cada uno de los grupos de microbianos se manifiesta por el aprovechamiento de la energía para la producción de los AGVs que resultan de la degradación de las paredes celulares y su actividad biológica. Al parecer las bacterias acetogenicas y sulfato reductoras son las que mayor energía producen en los diferentes ecosistemas intestinales, no es así con las bacterias metanogénicas que producen CH_4 y como resultado una pérdida de energía bruta del alimento ente 10 y 15% (Breznak *et al.,* 1990; Anderson *et al.* 2003; Soliva *et al.,* 2003; Ungerfeld *et al.* 2003).

Cuando sustancias reducidas son transferidas de bacterias ruminales fermentadoras de carbohidratos a bacterias metanógenas, el acetato se incrementa y generalmente el propionato disminuye. El acetato es preponderante bajo dichas condiciones pero no se considera precursor significativo de CH_4 en el rumen (Van Kessell y Russell, 1996). El acetato y el butirato promueven la producción de CH_4, mientras que la formación de

propionato puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H_2 en el rumen (Moss *et al.* 2000). De esta manera, la baja eficiencia está asociada con una alta proporción acetato:propionato, lo que involucra la producción de CH_4 (Van Soest, 1994). Moss *et al.* 2002, indican que los modelos basados en la estequiometría de la fermentación, se han usado para predecir la producción de CH_4, implicando una relación negativa entre la proporción molar de propionato y la excreción de CH_4 por unidad de sustrato fermentado. También reportan que la reducción en la proporción molar de propionato se asocia con un incremento en la excreción de CH_4 por kilogramo de materia orgánica fermentada (Carmona *et al.* 2005).

1.2.2. Estrategias de control de la metanogénesis en el rumen

Durante los últimos 30 años, se han considerado varias estrategias para la inhibición de la metanogénesis (Moss *et al* 2002; Dumitru *et al*. 2003), donde las líneas de investigación se ha enfocado en abordar el tema de reducción de la metanogénesis, clasificándose estos estudios en tres grandes grupos:

1) Disminución indirecta de CH_4 en el rumen, por ejemplo, la defaunación, estimulación de la fermentación propiónica en el rumen, disminución de la cantidad de carbohidratos estructurales y aumento de carbohidratos de fácil fermentación en la dieta.
2) Evaluación de productos que inhiben directamente a las bacterias metanogénicas; por ejemplo, la producción de vacunas, uso de extractos de plantas, ionóforos, antibióticos específicos, bacteriófagos y bacteriocinasas.
3) Evaluación de vías alternas para la utilización del H+ producido en el rumen, con el objetivo de limitar la producción de CH_4.

Con base en estos enfoques, se ha adicionado ácidos orgánicos precursores del propionato, así como bacterias acetogénicas que pueden usar H^+ y CO_2 en la producción de acetato (Rodríguez, 2009). Otras estrategias, se han orientado al mejoramiento de las características nutricionales del forraje y la implementación de sistemas estratégicos de suplementación, como la como los arreglos agrosilvopastoriles que pueden llegar a mejorar las características fermentativas ruminales, reflejándose en aspectos como mayor productividad y así mismo una disminución en las emisiones de CH_4 (Carmona *et al.* 2005). La mitigación de CH_4 puede llevarse a cabo por dos modos de acción: un **efecto directo** sobre los metanógenos o un **efecto indirecto** sobre la metagenesis por disponibilidad de sustrato . Ambos enfoques en las estrategias han demostrado eficacia a nivel *in vivo* (Tabla 1-1).

Actualmente el uso de aditivos en alimentos, ha destacado cuatro objetivos principales en su uso para optimizar la función ruminal:

1) Reducir la producción de CH_4 a favor del propionato para mejorar el balance energético de los animales,

2) Disminuir la degradación de las proteínas para incrementar la biodisponibilidad de aminoácidos en el intestino delgado,
3) Reducir la tasa de degradación de los carbohidratos rápidamente fermentables (almidón, sacarosa) y controlar la concentración de ácido láctico, y
4) Mejorar la digestión de la fibra.

Tabla 1-1. Estrategias de reducción de CH_4, mecanismo de reducción y consideraciones de uso.

Estrategia de reducción de CH4	Mecanismo de reducción la actividad	Consideraciones para la selección de la estrategia de reducción
Composición de la dieta Aumentar hemicelulosa / almidón Disminuir los componentes de la pared celular Molienda	Aumenta la tasa de pasaje, mayor proporción Propionato frente acetato, reducción del pH ruminal	Cambio Metanogénesis de intestino grueso o el estiércol, Riesgo de la acidosis ruminal subaguda (SARA)
Lípidos Ácidos grasos Aceites Semillas Sebo	Inhibición de metanógenos y protozoos; mayor proporción de propionato respecto al acetato; Biohidrogenación	Efecto sobre la palatabilidad, el consumo, el rendimiento y componentes de la leche; varía con la dieta y especie de rumiante.
Defaunación Química Aditivos alimenticios	Elimina los metanógenos asociados; perdida de hidrógeno para la Metanogénesis	La adaptación de la microbiota puede ocurrir; varía con la dieta, mantenimiento de animales defaunados.
Vacuna metanógena	Respuesta inmune del huésped a los metanógenos	Objetivo de la vacuna, dieta y huésped diferencia en ubicación geográfica.
Monensina	Inhibe protozoarios y bacterias gram-positivas; Carencia de sustrato para la Metanogénesis	La adaptación de la microbiota puede ocurrir; varía con la dieta y el animal; prohibidos en EU
Compuestos de plantas Taninos condensados Las saponinas Los aceites esenciales	Actividad antimicrobiana, Reducción en la disponibilidad de hidrógeno	Dosis óptima desconocida; necesaria más investigación in vivo, se necesitan estudios a largo plazo; puede afectar la digestibilidad; residuos desconocido.
Acidos orgánicos Fumarato Malate	Disipador de hidrógeno, mayor proporción de propionato en comparación con acetato.	Varía con la dieta, necesarias más investigaciones *in vivo*; necesarios estudios a largo plazo; pueden afectar la digestibilidad.

Fuente: Hook *et al.* 2010

En cuanto al reciente uso de **metabolitos secundarios** de los vegetales, como las saponinas, terpenoides, fenoles, glucósidos, taninos, ligninas, alcaloides, polisacáridos y aceites esenciales, se resalta la especificidad de estos compuestos hacía grupos microbianos, resultando útiles en la inhibición selectiva de algunos microorganismos indeseables en el rumen (Bonilla y Lemus, 2012)

Los tres principales componentes vegetales eficaces en la reducción de las emisiones de CH_4 *in vitro* son los **taninos condensados**, **saponinas** y **aceites esenciales,** sin embargo, a nivel i*n vivo* su efecto resulta variable, puesto que actualmente está bien establecido que estos diferentes compuestos bioactivos han mostrado afectar la población bacteriana en el rumen, su inhibición directa o indirecta en la producción de CH_4 implica un cambio en el perfil de los AGVs, como puede ser el aumento en la producción de ácido propiónico o ácido acético, debido al hidrógeno desplazado para la producción de éstos ácidos (Martínez *et al.* 2006)

Se ha reportado que los **Taninos condensados** inhiben directamente a los metanógenos y de manera indirecta pueden limitar la metanogénesis a través de una reducción en la disponibilidad de hidrógeno (Tavendale *et al.* 2002). En cuanto a las **saponinas**, se ha demostrado a nivel *in vitro* que inhiben los protozoos directamente (Guo *et al.* 2008) ya que resultan sensibles porque sus esteroles de membrana se unen con las saponinas (Wina *et al.,* 2005) generando un efecto indirecto sobre los metanógenos, como lo reportado por Hess *et al.,* en el 2003 tras conteos de protozoos mostrando una reducción del 54% y una disminución del 20% en la liberación de metano a nivel *in vitro* al incluir una furta rica en saponinas (*S. saponaria*); mientras que **los aceites esenciales** tienen actividades antimicrobianas que actúan mediante la inhibición de bacterias gram-positivas (Burt, 2004, Calsamiglia *et al.* 2007), llegando a reducir la cantidad de hidrógeno disponible para la metanogénesis.

1.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son compuestos volátiles y aromáticos que pueden ser extraídos de las plantas por métodos de destilación, en particular, la destilación al vapor (Greathead 2003). Químicamente, los AE son metabolitos secundarios compuestos principalmente de isoprenos o terpenos ($C_{10}H_{16}$) y pueden contener mezclas de diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), hemiterpenes (C_5), y sesquiterpenos (C_{15}). Cuando los isoprenos son asociados con elementos adicionales, por lo general de oxígeno, se denominan terpenoides (Cowan 1999). Los aceites esenciales han demostrado tener propiedades antimicrobianas contra diferentes tipos de microorganismos, incluyendo bacterias, protozoos y hongos (Greathead 2003).

Estudios a nivel *in vitro* han reportado recientemente efectos de los AE y sus componentes (CAE) sobre la fermentación ruminal y el metabolismo (McIntosh *et al.* 2003; Busquet *et al.* 2006), revelando efectos variables sobre las bacterias del rumen y la

fermentación ruminal (Busquet *et al.* 2006; Castillejos *et al.* 2006), a partir de un posible efecto selectivo sobre comunidades específicas microbianas ruminales, para disminuir la metanogénesis (Calsamiglia *et al.* 2006, Benchaar y Greathead, 2011). Aunque algunos resultados positivos ha sido reportados, también existen resultados contradictorios (Hart et al. 2008), probablemente porque el CH_4 es reducido por el AE de manera dependiente de la dosis y la concentración ruminal de la sustancia activa es crítica (Macheboeuf *et al.* 2008), presentándose discrepancias entre estudios en que se atribuyen a diferentes tipos y dosis de AE (Busquet *et al.* 2006.), sino también a la técnica in vitro utilizada (Fraser *et al.* 2007).

En dosis bajas, la fermentación ruminal no se ve afectada por los AE, mientras que dosis altas de estos compuestos inhiben a especies microbianas objetivo, así como la mayoría de los microorganismos del rumen (Benchaar *et al.* 2008), teniendo en cuenta lo repotado por McIntosh *et al*. en el 2003, quien sugiere un rango de concentraciones (de 35 a 360 mg/L) requerido para alterar el metabolismo de N en bacterias ruminales; sin embargo, a pesar de su bien demostrada actividad antibacterial contra una amplia gama de bacterias patógenas, los AE y sus compuestos parecen ser activos contra las bacterias ruminales sólo a dosis elevadas (es decir, 3000 mg/L) según lo demostrado recientemente por Busquet *et al.* (2006) en cultivos discontinuos de 24 h *in vitro*, reportando un incremento del pH, cambio no mostrado en dosis de 3 y 30 mg/L. (Benchaar *et al.* 2008). Así mismo, un número de AE han demostrado ser eficaces en la supresión de la producción de CH_4 en el rumen, con disminuciones hasta de un 94% (Chaves *et al.* 2008;. Macheboeuf *et al.* 2008;. Patra y Saxena, 2010; Patra, 2011), aunque tal respuesta en la mayoría de los casos está asociada a una inhibición general de fermentación no selectiva.

Sin embargo, el CH_4 puede ser disminuido en un 20 a 60% con la adición de algunos AE *in vitro* (Benchaar *et al.* 2008;. Patra, 2011). Los más ampliamente AE estudiados, por lo menos en cuanto a sus efectos sobre la producción de CH_4, han sido timol (tomillo), carvacrol (orégano), eugenol (clavo, canela), cinamaldehído (canela), anetol (anís, hinojo) y baya de enebro y aceite de menta (Calsamiglia *et al.* 2007;. Benchaar *et al.* 2008;. Benchaar y Greathead, 2011). Los efectos reportados varían para cada compuesto y, dentro de cada AE, puede haber quimiotipos con actividad variable. Cuando se combinan en mezclas de AE, estos componentes pueden mostrar efectos antagónicos, aditivos o sinérgicos (Calsamiglia *et al.* 2007).

Benchaar *et al.* en el 2007, evaluaron *in vitro* los efectos de cinco AE (hoja de canela, hojas de clavo, naranja dulce, orégano, tomillo y aceite) y cuatro CAE (carvacrol, cinamaldehído, eugenol, timol y) sobre la fermentación microbiana ruminal. Los resultados revelaron que entre el AE y CAE evaluados sólo los CAE (carvacrol, timol, y eugenol) exhibieron actividades antimicrobianas *in vitro*. Este tipo de compuestos, han demostrado que poseen una alta actividad antimicrobiana debido a la presencia de un grupo hidroxilo en la estructura fenólica (Dorman y Deans 2000; Ultee *et al.* 2002;. Burt 2004). Los compuestos con estructuras fenólicas tienen un amplio espectro de actividad contra una variedad de bacterias tanto Gram-positiva como las Gram-negativas (Kim *et al.*

1995;. Helander *et al.* 1998; Dorman y Deans de 2000; Lambert *et al.* 2001). El mecanismo de acción por el cual los compuestos fenólicos se piensa ejercen su actividad antimicrobiana es a través de la perturbación de la membrana citoplásmica, lo que altera la fuerza motriz de protones, el transporte activo de flujo de electrones, y coagulación del contenido celular (Burt 2004).

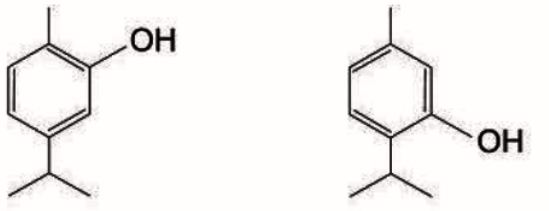
La actividad antimicrobiana de timol y carvacrol, los monoterpenos fenólicos encontrados en altas concentraciones en el AEO está bien documentada (Helander *et al.* 1998; Ultee *et al.* 1999) demostrando incrementar la fluidez y permeabilidad de la membrana citoplasmática que conduce a la pérdida de contenido y lisis celular (Trombetta *et al.* 2005;. Di Pasqua *et al.* 2007;. Paparella *et al.* 2008;.. Xu *et al.* 2008). Posiblemente, en respuesta a la creciente fluidez de la membrana citoplasmática causada por el timol y el carvacrol, un aumento de proporción de los ácidos grasos saturados e insaturados de la membrana fueron reportados en bacterias expuestas a estos monoterpenos fenólicos (Di Pasqua *et al.* 2006, 2007).

Otro mecanismo de acción es la oxidación del metano, suprimido por la presencia de oxigeno. La inhibición por la adición de O_2 sugiere que la oxidación de metano en el rumen es 'anaerobia'; lo cual ha sido reportado en cultivos puros de bacterias oxidantes de metano (Zehnder y Brock 1979; Harder, 1997), y también se produce en los campos de arroz, lagos, ríos y ambientes oceánicos (Panganiban *et al.* 1979; Murase y Kimura 1994; Blair y Aller 1995; Hansen *et al.* 1998), y es en este contexto donde bajo ciertas condiciones, por ejemplo, altas concentraciones de antioxidantes fenólicos, un pH elevado o en presencia de hierro, los antioxidantes fenólicos pueden iniciar un proceso de auto-oxidación y se comportan como prooxidantes (Bravo,1998).

El timol, es un monoterpeno fenólico [(5-metil-2-(1-metiletil) fenol)] (Figura 1-2) y es uno de los principales compuestos de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgaris*). El timol se ha demostrado que tienen un amplio espectro de actividad contra una variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. (Dorman y Deans, 2000; Lambert *et al.* 2001; Walsh *et al.* 2003). Han sido reportados los efectos de timol y de los aceites esenciales con alto contenido de timol sobre la fermentación ruminal (Castillejos *et al.* 2006, 2008,. Martínez *et al.* 2006; Benchaar *et al.* 2007), pero sólo unos pocos han determinado específicamente sus efectos sobre la metanogénesis ruminal.

Benchaar *et al.* (inédito) observaron una reducción del 32% en la concentración de CH_4 cuando se suministró timol *in vitro* en un cultivo de incubación de 24 h a 300 mg/L de fluido cultivado, generando una disminución de las concentraciones de AGVs totales, acetato y propionato. Curiosamente, en el estudio de Macheboeuf *et al.* (2008), la extensión de la reducción en la producción de CH_4 fue más pronunciada con aceite de tomillo (proporcionando 300 mg/L de timol) que cuando se proporcionó timol solo en incubaciones a la misma concentración (-62 Frente -32%, Respectivamente), lo que sugiere que otros constituyentes en el aceite esencial de tomillo contribuyeron a su actividad antimicrobiana.

El **carvacrol** [2-metil-5-(1-metiletil)-fenol] es un compuesto fenólico que se encuentra principalmente en la fracción de aceite esencial de *Orégano* y *Tomillo*. Como el timol, la alta actividad antimicrobiana de carvacrol se ha atribuido a la presencia de un grupo hidroxilo en la estructura fenólica (Figura 1-2) (Dorman y Deans, 2000; Ultee *et al.* 2002;. Burt, 2004). Macheboeuf *et al.* (2008) observó una disminución lineal en la producción de CH_4 cuando se suministró carvacrol a 225 (-13%), 300 (-32%), 450 (-85%) y 750(-98%) mg/L en cultivo por lotes. En el mismo estudio, la producción de CH_4 no se vío afectada mediante la adición de AEO *O. vulgare* (890 g/kg de carvacrol, y 50 g/kg de timol) a concentraciones de 150 y 300 mg/L, mientras que a 450 y 750 mg/L CH_4 fue marcadamente inhibida (-63 y -97%, Respectivamente).



Carvacrol **Timol**

Figura 1-2. Estructura química del carvacrol y del timol (Burt, 2004).

En los últimos años, el número de artículos de investigación publicados sobre los efectos de los AE y los CAE en la fermentación ruminal microbiana se ha incrementado. La mayor parte de esta la investigación es a corto plazo y se ha utilizado en sistemas *in vitro*. Como estos compuestos son suplementos relativamente nuevos en la alimentación animal (Wallace, 2004), sus efectos sobre la fermentación y a nivel nutricional en general son desconocidos. Debido a la importancia de la producción entérica CH_4 en la alimentación y la producción de rumiantes (es decir, pérdida de energía y la contribución a las emisiones de gases de efecto invernadero), estudios han reportado el potencial de estos compuestos para inhibir selectivamente la metanogénesis ruminal; basándose en múltiples resultados hasta la fecha, donde al parecer los compuestos fenólicos o AE con altas concentraciones de estos compuestos a nivel *in vitro*, pueden ser eficaces en la disminución de la producción de CH_4.

1.3.1. Aceite esencial de orégano (AEO)

En el mundo, existen diferentes tipos de orégano entre ellos se encuentra el género *Origanum* que pertenece a la familia Lamiaceae y el Lippia, a la familia Verbenaceae. El género *Lippia* es uno de los géneros de mayor explotación de sus aceites esenciales que

incluye alrededor de 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños; la mayoría se encuentran distribuidos en Centro y Sudamérica, y en la zona tropical africana (Kintzios, 2002).

El orégano (*Origanum vulgare L.*) como una planta aromática, se ha utilizado en la medicina por un largo tiempo. Hoy en día, la planta todavía se utiliza en la medicina popular. Como planta medicinal, el orégano se ha utilizado como un antimicrobiano (Dorman y Deans, 2000; Elgayyar *et al.* 2001;. Marino *et al.* 2001), anticoccídico (Giannenas *et al.* 2011), antifúngico (Pina-Vaz *et al.* 2004; Soliman y Badea, 2002) y antioxidante (Lee y Shibamoto, 2002; Miura *et al.* 2002; Youdim y Deans, 1999; Zheng *et al.,* 2001).

En Colombia, en el cordón panamericano, zona en desertificación del sur del país, especialmente en la zona del alto Patía abunda de forma silvestre, una especie de orégano, clasificado como *Lippia origanoides* Kunth, un arbusto del cual se vienen utilizando sus aceites esenciales en sistemas de alimentación animal como aditivo nutracéutico por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Los principales componentes de los aceites esenciales de orégano (AEO) corresponden a las moléculas de carvacrol y timol, constituyendo del 78 al 82% (Tabla 1-2) del total del aceite y son los que exhiben la actividad antimicrobiana (Nuñez, 2011).

Tabla 1-2. Composición relativa de AEO de *Lippia origanoides* y *Oregano vulgare* Hirtum.

Localidad	Carvacrol	Timol	p-Cimeno	γ-Terpireno	Compuestos entre 1,0 y 4,0%	Compuestos menores al 1%
Oregano vulgare Hirtum	90.3	3,5	2,7	1	1	2,7
Lippia origanoides	1,1	72,3	7,7	3,6	8,3	5,4

Fuente: Vásquez, 2011. *Los compuestos entre el 1,0 y el 4,0 % son: trans-β-cariofileno, α-humuleno, timol metiléter, terpinen-4-ol y acetato de timilo. **Los compuestos con una concentración ≤1,0 % son α-pineno, β-mirceno, α-felandreno, γ-3-careno, α-terpineno, limoneno, β-felandreno, eucaliptol, trans-β-ocimeno, cis-hidrato de sabineno, terpinoleno, linalool, trans-hidrato de sabineno, umbellulona, cis-α-bergamoteno, γ-muuroleno, viridifloreno, sesquiterpenol, β-bisaboleno, óxido de cariofileno y epóxido II humuleno. (Nuñez, 2011)

1.3.2. Modo de acción del AEO sobre la actividad microbiana

Debido a su naturaleza lipofílica, los AE tienen una alta afinidad por las membranas celulares microbianas, cuyos componentes interacutan con los grupos funcionales de los AE (Jouany y Morgavi, 2007), generando alteraciones en el transporte normal de iones (electrónes) a través de la membrana, modificando procesos como la translocación de proteínas, fosforilación y reacciones dependientes de enzimas (inactivación de las enzimas microbianas) (Benchaar *et al.* 2008;. Patra y Saxena, 2010) y en consecuencia,

comprometiendo gravemente la viabilidad y la actividad de los microorganismos ruminales. Como la composición de la pared celular microbiana varía ampliamente entre especies bacterianas, los AE afectan en mayor medida las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas (Benchaar y Greathead, 2011).

Generalmente, los metanógenos ruminales parecen ser afectados sólo en altas concentraciones de AE (McIntosh *et al.* 2003). Se ha sugerido que los AE pueden causar cambios en las comunidades de archaeas o en su actividad para reducir la tasa de producción de CH_4 (Ohene-Adjei *et al.* 2008). Los AE pueden afectar el crecimiento de los hongos y los virus, y algunos protozoarios ruminales que albergan metanógenos pueden ser afectados de forma selectiva (Jouany y Morgavi, 2007; Patra, 2011), aunque los efectos antiprotozoicos son inconsistentes y variables entre los compuestos utilizados (Patra y Saxena, 2010; Patra, 2011). Sin embargo, al parecer los microorganismos del rumen pueden ser capaces de adaptarse a la exposición de los AE, resultando ineficaz el efecto inicial agudo de disminución de la producción de CH_4 a mediano plazo (Benchaar y Greathead, 2011).

1.4. Técnicas de evaluación de la degradación de los forrajes y metanogénesis en el rumen

Los sistemas *in vitro*, han servido para estudiar aspectos de la microbiota ruminal, convirtiéndose en una herramienta útil para examinar los procesos metabólicos que tienen lugar durante la fermentación de los alimentos, y se han usado para estimar la fermentación *in vivo* y analizar la evolución de las cinéticas de fermentación y de las propias comunidades microbianas. Suponen una simplificación importante del complejo proceso de fermentación ruminal y generan información que es de gran utilidad para el diseño y clarificación de los ensayos *in vivo* (Merry *et al.* 1990).

En el caso del CH_4, este puede ser determinado por espectrometría infrarroja fotoacústica- analizador de gas traza (TGA), espectroscopia de absorción de infrarrojos de transformación de Fourier, espectroscopia de masa, espectroscopia de absorción de láser de diodo sintonizable (TDL) o por cromatografía de gases (López y Newbold, 2007); y cuya medición puede ser dada tanto por métodos *in vitro* como *in vivo*.

1.4.1. Métodos *in vitro*

La mayoría de los procedimientos *in vitro* desarrollados hasta el momento miden la desaparición de sustrato en un punto final de medida. Con el objetivo de obtener sistemas reproducibles y repetibles, se han propuesto sistemas estáticos y estandarizados. Para el estudio de la digestión ruminal, la mayoría de los sistemas utilizan inóculo microbiano. Las simulaciones *in vitro* del medio ambiente ruminal son frecuentemente efectivas y eficientes por su rapidez y bajo costo de operación. Además, porque se pueden definir ***in vitro*** factores específicos, que en condiciones *in vivo*, pueden ocultarse por una gran

complejidad de factores (Getachew *et al.* 1998; Kajikawa *et al,* 2003). A nivel ***in vitro*** los métodos más utilizados son:

Rumen artificial (RUSITEC): se emplea un equipo que normalmente consiste de ocho sistemas de flujo continuo donde interactúan la fase líquida y sólida del rumen, las muestras a analizar (confinadas en bolsas de nylon) y un sistema buferante o de saliva artificial que permite en el sistema un control del pH (Kajikawa *et al.* 2003).

Técnica de producción de gas *in vitro* (IVGPT):

El método basado en el principio de determinación de la degradabilidad del alimento mediante la cuantificación el gas producido en un cultivo fue desarrollado en primer lugar por autores como Mc Bee (1953) y Hungate (1966). Trei *et al.* (1970), Jouany y Thivend (1986), Beuvink y Spoelstra (1992) adaptaron las primeras técnicas añadiendo dispositivos manométricos (basados en el desplazamiento de un volumen de agua) a las botellas para medir el gas producido. (Martínez, 2009). También aparece el método desarrollado en la Universidad de Hohenheim en Alemania o Test de Gas de Hohenheim (HGT) (Menke *et al.* 1979) y modificado por Menke y Steingass (1988). La determinación de los productos finales de la fermentación y los residuos no fermentados, en conjunto con los perfiles de producción de gas, permite estimar la tasa, extensión y eficiencia de la fermentación. La medición de la producción acumulada de gas, como indicador del metabolismo del carbono, centra su atención en la acumulación de los productos finales de la fermentación: CO_2, CH_4 y AGVs. Este sistema presenta ventajas tales como que el producto final que se mide (gas) es resultado directo del metabolismo microbiano, y de que la formación de productos finales de la fermentación, pueden ser monitoreados a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descrita con precisión. Esta técnica de producción de gas aparece como un sistema *in vitro* de alta capacidad operativa y de bajo costo, en la cual los perfiles de producción de gas pueden ser generados utilizando sistemas, semi o totalmente automatizados (Posada y Noguera 2005).

Sistemas automáticos: el modelo de Beuvink *et al.* (1992) se basa sobre el peso del fluido desplazado por el gas de fermentación de botellas individuales; se toma el cambio en el peso y se realiza un cálculo para convertir el peso a volumen de gas (Posada y Noguera, 2005). Los restantes sistemas automáticos difieren en que si los frascos permanecen cerrados y la presión acumulada es registrada (Pell y Schofield, 1993) o si los frascos son desahogados de acuerdo a un umbral de presión dado o intervalo de tiempo (Davies *et al.*1993; Cone *et al.*1996).

Sistema semiautomático: Hace referencia al sistema británico de Theodorou *et al.* (1994), donde la incubación se realiza en frascos sellados presentando acumulación de los gases de la fermentación en el espacio superior, y se emplea una jeringa/transductor de presión que va midiendo y liberarando el gas acumulado hasta restaurar la presión

atmosférica al interior de la botella, y es la presión acumulada en el espacio superior la que se emplea para estimar el volumen de gas (Posada y Noguera 2005).

Para medir la producción de gas se emplean aproximaciones tales como: 1) La presión atmosférica constante, 2) El volumen fijo y 3) una combinación de las anteriores mediante la medición del incremento de volumen necesario para causar un cambio definido de presión (Posada y Noguera, 2005). Los métodos manométricos iniciales y sus modificaciones (Hungate, 1955; Beuvink *et al.*1992) son ejemplos de la primera aproximación, midiendo la cantidad de agua desplazada debido a la acumulación de gas. Otro ejemplo es el desarrollado en Alemania por Menke *et al.*1979 y sus modificaciones, (Menke y Steingass, 1988; Blummel y Ørskov, 1993). La sensibilidad de la jeringa utilizada para la medición en estas técnicas es baja. Los métodos manométricos fueron superados por el desarrollo de transductores de presión a pequeña escala con el cual es posible monitorear la producción de gas manualmente (Theodorou *et al.*1994) o en forma totalmente automatizado (Beuvink *et al.* 1992; Pell y Schofield, 1993).

Todos los transductores miden, las diferencias de presión que se generan en el espacio que queda libre dentro de la botella de incubación, descontándole el espacio ocupado por el tapón y la muestra incubada en la fase líquida, ofreciendo una vía sencilla y precisa de medir la producción de gas; sin embargo, la diferencia más importante en las variantes reportadas (Pell y Schofield, 1993; Theodorou *et al.* 1994; Cone *et al.*1996 y Mauricio *et al.* 1999), radica en la evacuación o no, del gas generado durante la fermentación entre los intervalos de medición, Theodorou *et al.* (1994; 1995) reportaron perturbaciones en el crecimiento microbiano por no extraer el gas generado en los diferentes intervalos de tiempo, mientras que los investigadores de la Universidad de Cornell no (Schofield y Pell, 1995).

Modelación de perfiles de producción de gas: Las funciones matemáticas han sido largamente utilizadas en la ciencia animal y vegetal para cuantificar la relación entre el desarrollo de un organismo, órgano o tejido y el tiempo. La producción de gas depende de una secuencia de procesos: Inmediatamente posterior a la incubación, el substrato es parcialmente solubilizado y los componentes solubles rápidamente fermentados. Los componentes insolubles en tanto, requieren ser hidratados y colonizados por los microorganismos del rumen previo a ser fermentados.

Los diferentes sustratos o sus componentes varían en el grado de resistencia a los procesos mencionados, dando lugar al ser incubados a perfiles de producción de gas completamente diferentes. La descripción matemática de los perfiles de producción acumulada de gas es una herramienta fundamental, no sólo para comparar substratos o condiciones de fermentación, sino para obtener información de diferentes fracciones nutricionalmente relevantes (Groot *et al.* 1996; Cone *et al.* 1997).

El ajuste de los perfiles acumulados de gas a una apropiada ecuación permite resumir la información cinética (Williams, 2000). Así, la descripción matemática de las curvas de

producción de gas permite la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y proporciona información sobre la composición del sustrato y las tasas de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales (Groot *et al.* 1996; Noguera *et al.* 2004).

Varios modelos están disponibles para la parametrización de los perfiles de degradación (Beuvink y Kogut,1993), todos ellos con ventajas y desventajas de ajuste estadístico uno frente al otro dependiendo de las condiciones experimentales y del tipo de sustrato, lo que hace necesaria su evaluación con el fin de escoger el mejor para cada situación y no la utilización indiscriminada de un único modelo (Noguera *et al.* 2004). La escogencia del modelo no deberá tener solamente en cuenta consideraciones matemáticas, sino también el significado biológico de los parámetros (Williams, 2000).

El incremento en la frecuencia de las lecturas de la producción de gas conduce a la obtención de perfiles muy detallados (Williams, 2000). La cinética de fermentación cuantificada con una alta precisión, donde los diferentes procesos pueden ser identificados requiere de la utilización de modelos multifásicos (Groot *et al.* 1996; Noguera *et al.* 2004); el valor potencial para estos modelos es que separan el sustrato evaluado en las fracciones más rápida y más lentamente fermentables (Williams, 2000).

Los perfiles de producción de gas pueden ser descritos por un modelo trifásico (Cone *et al.* 1997). Los componentes solubles son rápidamente fermentados después de la incubación y subsecuentemente, un cambio gradual ocurre hacia la fermentación de las partes insolubles, las cuales necesitan ser hidratadas y colonizadas por los microorganismos ruminales antes de ser fermentadas. Por último, el gas se produce por el reciclaje de la población microbiana y no por la fermentación del alimento (Van Milgen *et al.* 1991; Cone *et al.* 1997). Acerca de esta última fase, es conveniente evitar prolongadas fermentaciones después del agotamiento del sustrato, porque la lisis microbiana hace los datos difíciles de interpretar (Stefanon *et al.* 1996). Schofield *et al.* (1994) proponen el modelo no lineal logístico con múltiples fases asumiendo que la tasa de producción de gas de un pool es proporcional a la masa microbiana y al nivel de sustrato disponible, y da un valor cuantitativo satisfactorio de las fracciones que tienen un comportamiento diferencial.

1.4.2. Métodos *in vivo*

En cuanto a les **técnicas *in vivo*,** hay diversas opciones para medir las emisiones de metano, empleando técnicas con cámaras cerradas o métodos con trazadores a partir de muestreos individuales o grupales (Carmona *et al.* 2005)

Técnicas con trazadores: Las técnicas con trazadores con isótopos involucran el uso de [3H-] metano o [14C-] metano y animales canulados a rumen. La mayor limitación con trazadores isótopos es la dificultad en la preparación de la solución por la baja solubilidad

del metano. Las técnicas con trazadores no isótopos como el hexafluorosulfuro (SF6, gas trazador colocado en el rumen), también son útiles en la medición de producción de este gas. La ventaja radica en que no limita al animal en su comportamiento normal en pastoreo (Johnson y Johnson, 1995; McCaughey *et al.* 1997, 1999)

Ecuaciones de predicción: el método desarrollado en 1960 por Wolin permite calcular las emisiones de metano a través de la distribución molar de los AGVs.

Cámaras metabólicas: Según lo describe Klein y Wright (2006), la construcción de un sistema de cámaras de circuito abierto se hace mediante un cuadrante de aluminio con láminas de fibra de vidrio transparente, que tiene dentro una jaula en acero donde se ubica el animal para que se le suministre el agua de bebida y la dieta a evaluar. La cámara posee un ventilador de alta velocidad, el cual deshumifica y permite que circule el aire. El volumen del total del aire circulado a través del calorímetro es calculado al final y al inicio mediante un medidor de gases secos (Cárdenas, 2009)

Técnica Argentina: técnica propuesta por Berra *et al.* (2007), y consiste en la necesidad de canular el rumen realizando una fístula colocando una manguera plástica, en el costado izquierdo de la cavidad abdominal. El sistema de colecta del gas consiste de una fístula plástica a la cual se adhiere una bolsa plástica de 350 litros de volumen. (Cárdenas, 2009).

Técnica del túnel: esta técnica consiste en utilizar un sistema de cámara cerrada que permite capturar el metano producido por los rumiantes, que es eliminado por medio del eructo y las heces. Estas cámaras son estructuras de tipo inflable, lo que facilita el establecimiento en diferentes condiciones (Murray *et al.* 2004; Angarita *et al.* 2007).

1.5. Métodos de estudio de ecología microbiana ruminal por técnicas moleculares

La microbiota ruminal ha sido el foco de investigación microbiana durante más de medio siglo en busca de mejorar la nutrición de los rumiantes. Antes del advenimiento de técnicas de biología molecular, los microorganismos en el rumen y tracto gastrointestinal, como en otros hábitats, fueron estudiados con técnicas basadas en cultivo, que sólo permiten el aislamiento y caracterización de un número limitado de especies fácilmente cultivables.

El microbioma ruminal, como otros microbiomas, fue investigado principalmente utilizando métodos a base de cultivo por muchas décadas hasta la década de 1980, cuando fue aplicado como objetivo de análisis el gen 16S rRNA (Stahl *et al.* 1988). Bacterias y arqueas fueron cultivadas y ambas ayudaron a definir algunas de las mas importantes funciones del metabolismo ruminal (Hobson y Stewart, 1997), sin embargo, pronto se hizo evidente que la mayoría de los microorganismos del rumen escapaban del cultivo de laboratorio (Whitford *et al.* 1998). A partir de entonces, la mayoría de estudios han tratado

de caracterizar el microbioma ruminal por análisis filogenético de gen 16S ARNr recuperando las secuencias en bibliotecas de clones mediante amplificación por PCR directa (Edwards *et al.* 2004; Deng *et al.* 2008.).

Algunos de los estudios basados en el ADN, se centraron en los microorganismos presentes en fluido ruminal (Tajima *et al.* 2000, 2007; Ozutsumi *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2009), mientras que otros estudios analizaron la partición de microorganismos en el fluido ruminal o incrustados en el biofilm adherido a partículas alimenticias separadamente (Larue *et al.* 2005;. Yu *et al.* 2006; Brulc *et al.* 2009). Las muestras de contenido ruminal pueden ser colectadas vía oral o directamente en el rumen por medio de cánula y de cualquier manera, una eficiente metodología de extracción es un pre-requisito en estudios moleculares de ecología microbiana del rumen (Makkar, 2005).

La aplicación de técnicas moleculares independientes del cultivo, son más sensibles y precisas para el estudio de los microorganismos ruminales y del tracto gastrointestinal, empleandose como alternativa para examinar directamente la diversidad y la estructura de la comunidad de la microbiota de este ecosistema, sobre la base de genotipos, en lugar de fenotipos (Tajima *et al.,* 1999, Whitford *et al.* 1998, Yu y Forster, 2005). Al examinar una comunidad, es importante distinguir y definir el objetivo entre identificación, cuantificación y monitoreo, dado que el objetivo define el tipo de ácido nucleico (ADN o ARN) y la selección de la técnica a utilizar (Ackie *et al.* 2000).

A continuación se enuncia una clasificación general de los enfoques moleculares en el estudio de metanógenos ruminales descritos por Zhou *et al.* (2011), incluyendo una descripción general, uso principal, avances y limitaciones de estas técnicas (Tabla 1-3)

Tabla 1-3. Resumen del uso de técnicas moleculares en microbiología del rumen

Método	**Descripción**	**Uso principal**	**Avances**	**Limitaciones**
FISH	Hibridación *in situ* con fluorescencia.	Uso de sondas flourescentes que hibridan genes específicos de la población objetivo.	Distribución de la observación *in vivo*; estimación relativa de abundancia	Se requieren muestras frescas; la complejidad de la muestra puede evitar la hibridación.
PCR	Uso de primer universal o especifico esencial para enriquecer el ADN de las células microbianas que son presentes en baja cantidad.	Genes específicos	Enriquecimiento de abundancia molecular para análisis posteriores	Errores de amplificación. No es medida cuantitativa.
qRT-PCR	Cuantifica la abundancia de la comunidad y cambios de la misma ante condiciones ambientales. Estima la Densidad relativa:objetivo vs poblacion de refeencia, y tambén la Cantidad absoluta, objetivo vs. Estándar externo	Genes específicos	Enumeración de genes focalizados, identificación de menores consorcios microbianos	Se requiere de un estándar externo

Librerias de clones de ADN	Determina la identidad de cada contituyente dentro del ecositema microbiano.	Genes específicos	Investigación de la composición microbiana; consulta bajo datos de referencia (bancos de secuencias)	Sesgo debido a la selección del cebador
PCR-DGGE/TTGE (Electroforesis en gel con gradiente denaturante de temperatura)	Comparación de comunidades de diferente origen, así como alteraciones	Genes específicos	Observación de composición microbiana y patrones de cambio: Visualiza la diversidad composicional por diferentes patrones de bandas (filotipos microbianos).	No es medición cuantitativa. Mismas bandas pueden representar la misma especie
T-RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica)	Caracterización de comunidad microbiana en muestras ambientales y definir su dinámica.	Genes específicos	Detección de composición microbiana. Creación de perfiles microbianos empleando enzimas de restricción generando huellas genomicas del fragmento objetivo. Separa por tamaño.	No es medición cuantitativa; subestimación de la biodiversidad por limitación de migración del gel
Secuenciación del genoma entero	Permite la rápida caracterización de secuencias específicas.	ADN total de una sola especie	Conocimiento sobre todos los genes; predicción y explicación de rasgos fenotípicos	Limitación de la disposición de cultivo y aislamiento del microorganismo.
Metagenómica	se utiliza comúnmente para revelar el potencial genético de una comunidad microbiana del medio ambiente mediante un screening (nuevas enzimas o probables actividades) general dentro de este entorno.	ADN total de una muestra completa	Identificación de genes de todos los organismos incluyendo los no descubiertos; predicción de metabolismo desconocido.	Organización e Interpretación de los metadatos.

Fuente: Zhou *et al.* (2011)

1.5.1. Metagenómica y pirosecuenciación

La introducción de nuevas y potentes tecnologías en las últimas dos décadas ha conducido a muchos avances en microbiología. La primera, la genómica (mapeo y secuenciación de genomas y análisis y función del gen) ha revolucionado las ciencias biológicas. La genómica ofrece la capacidad de investigar rápidamente todas las características biológicas de un organismo seleccionado y sin desarrollo previo de un sistema genético específico para el organismo elegido. Actualmente, más de 2.900 genomas son publicados y más de 11.000 proyectos del genoma se enumeran en la

Genoma Online Database (www.genomesonline.org). Ahora, los procesos biológicos fundamentales pueden ser estudiados mediante la aplicación de toda la gama de tecnologías ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, entre otras), estas proveen de mayor información a diferentes niveles, a saber: el genoma y transcriptoma, con todos los genes que son convertidos en transcritos como ARNm; el proteoma, refriéndose a todas las proteínas celulares; metaboloma, como todos los productos metabólicos e intermediarios de la célula; el interactoma siendo el set de moléculas producto del metabolismo con actividad biológica que interactúan con las proteínas y el fenoma, entendido como todas las características observables de un organismo (McSweeney y Mackie, 2012).

La genómica, se puede definir como el estudio de toda la secuencia del genoma y la información contenida en el mismo, y claramente la más madura de las diferentes ómicas (Joyce y Palsson, 2006), consta del mapeo y secuenciación de los genomas para analizar los genes y sus funciones (McSweeney y Mackie, 2012). En la evolución de la genómica, tras el estudio de genomas colectados de un ecosistema, la metagenómica es la que proporciona el acceso a la composición funcional de genes de las comunidades microbianas y por lo tanto da una descripción mucho más amplia que estudios filogenéticos; que a menudo se basan sólo en la diversidad de un gen, como por ejemplo, el gen 16S ARNr. La metagenómica, proporciona información genética acerca de potenciales nuevos biocatalizadores o enzimas, los vínculos entre la función genómica y la filogenia de los organismos no cultivables y perfiles evolutivos de la función y estructura de la comunidad (Wilmes y Bond, 2006, Gilbert *et al.* 2008), fundamentándose en los análisis de secuencias y funcionalidad del set de genes, donde se requiere del proceso de extracción de ADN genómico a partir de una muestra ambiental (Handelsman, 2004).

El creciente interés en los proyectos de metagenomas y avances en herramientas bioinformáticas, impulsó la creación de plataformas de secuenciación de alto rendimiento, clasificando los tipos de secuenciación de acuerdo al tipo de plataforma y capacidad de generar mayor cantidad de lecturas en menor tiempo y a menor costo (Metzker, 2010; Petrosino *et al.* 2009)

Durante los últimos 10 años la secuenciación metagenómica ha cambiado gradualmente desde la tecnología clásica de secuenciación Sanger a la técnica de secuenciación de próxima generación (SPG) (next-generation sequencing (NGS)), sin embargo, la secuenciación Sanger todavía se considera el estándar para la secuenciación, debido a su baja tasa de error, larga longitud de lectura (>700 pb) y grandes tamaños de inserto (Thomas, *et al.*. 2012). El método automatizado de Sanger se considera como una tecnología de 'primera generación', del cual se derivaron las metodologías de secuenciación o de los dideoxinucleótidos, desarrollada en 1977. Este proceso involucra varias técnicas como la clonación bacteriana o PCR, purificación de templados, marcaje de fragmentos de ADN, tinción de dideoxinucleótidos, electroforesis capilar y detección

por fluorescencia de la secuencias de los nucleótidos en un fragmento de ADN (Metzker, 2010).

La llegada de las tecnologías (SPG) al mercado ha cambiado la forma de pensar acerca de los enfoques científicos en la investigación básica, aplicada y clínica. El avance importante ofrecido por las SPG es la capacidad de producir un enorme volumen de datos de forma económica (Metzker, 2010). Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento son la base para estudios complejos del ecosistema y la combinación única de protocolos específicos distingue una la tecnología de otra y determina el tipo de datos producidos a partir de cada plataforma. Estas diferencias en la salida de los datos es uno de los retos presentes cuando se comparan las plataformas sobre la base de la calidad y cantidad de los datos y el costo. (Metzker, 2010). A continuación se describen características de las principales plataformas de secuenciación. (Tabla 1-4) .

Tabla 1-4. Características de las principales plataformas de secuenciación

Plataforma	Longitud de lectura (bases)	Tiempo de corrida (días)	Gb por corrida	Ventajas	Deventajas
Roche/454's GS FLX Titanium	330*	0.35	0.45	Lecturas más largas para mejorar el mapeo de las regiones repetitivas; tiempos de ejecución rápida	Alto costo de reactivos, alta tasa de errores en repeticiones de homopolímeros
Illumina/ Solexa's GAII	75 o 100	4‡, 9§	18‡, 35§	Actualmente la plataforma más ampliamente utilizada.	Baja capacidad de multiplexación de muestras
Life/APG's SOLiD 3	50	7‡, 14§	30‡, 50§	La codificación en dos bases proporciona corrección de errores inherentes	Largos tiempos de ejecución
Helicos BioSciences HeliScope	32*	8‡	37‡	El sesgo no es representativo de los patrones para aplicaciones de genoma y seq-base	Altas tasas de error en comparación con otras químicas terminadoras reversibles
Pacific Biosciences	964*	N/A	N/A	Tiene el mayor potencial para lecturas que excedan a 1 kb	Las más altas tasas de error en comparación con otras químicas SPG

*** Promedio de longitudes de lectura. ‡ Fragmento de ejecución. §Mate-pair run. Fuente: Metzker, 2010)**

Dentro de las técnicas moleculares más usadas para evaluar la diversidad y filogenia de las comunidades microbianas a través de las huellas moleculares que codifican los genes de regiones conservadas del 16S ADNr se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE), T-RFLP y

pirosecuenciación, siendo esta última comunmente empleada en el análisis de la composición de las comunidades microbianas en sistemas complejos (Nakayama, 2010).

La pirosecuenciación 454 de alto rendimiento comercializada por Roche® (Roche/454 Life Sciences) forma parte de la 3° generación al igual que Illumina/Solexa y SOLiD, las cuales producen 75-100 y 50 pb con 18-35 y 30-50 Gb/corrida respectivamente. La ventaja metodológica que se puede encontrar en la química de la pirosecuenciación-454 es su capacidad de producir secuencias de mayor tamaño comparadas con las demás (Metzker, 2010), lo que permite reducir las dificultades al estimar índices de riqueza por distancias filogenéticas (Robinson *et al.* 2010).

Los enfoques principales en metagenómica implican el análisis funcional o de secuencia basados en el ADN extraído de una comunidad microbiana, cuyo objeto es organizar la información genómica para consulta, y así obtener información sobre los genes predominantes, cómo están regulados y su contribución al funcionamiento de los ecosistemas. Las secuencias de ADN generadas por estos métodos son ensambladas y anotadas por análisis computacionales tomando como referencia los genomas conocidos depositados en las bases de datos públicas. (McSweeney y Mackie, 2012).

Actualmente, se hace el uso de bases de datos como RDP II (Ribosomal Database Proyect II http://rdp.cme.msu.edu/) que se basa en la taxonomía de Bergey; Greengenes (http://greengenes.lbl.gov), que incluye múltiples esquemas taxonómicos permitiendo clasificar los resultados para hacer comparaciones y ARB-SILVA (http://www.arb.silva.de/), cuya precisión en la clasificación taxonómica depende en gran medida de bases de datos curadas (Petrosino *et al.* 2009). Básicamente, estas bases de datos procesan las secuencias obtenidas, alineándolas y agrupándolas por su similitud respecto a secuencias de referencia para su clasificación taxonómica (Robinson *et al.* 2010). Para el siguiente paso, se requieren otras herramientas bioinformáticas especializadas en meta-análisis como MG-RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology for Metagenomes) y QIIME (http://qiime.sourceforge.net/) que facilitan el proceso de comparaciones filogenéticas, anotaciones funcionales, perfiles filogenómicos y reconstrucciones metabólicas dependiendo el objetivo del trabajo (Meyer *et al.* 2008; Robinson *et al.* 2010).

Muchos trabajos se están adelantando en esta área para el ecosistema ruminal. Sin embargo, dada la complejidad del mismo, las metodologías empleadas por ahora se enfocan en la secuenciación de genomas completos como el de *Methanobrevibacter ruminantium* (Leahy *et al.* 2010) y la composición de las comunidades a través de secuenciación de siguiente generación como pirosecuenciación (Jami y Mizrahi, 2012; Kittelmann *et al.* 2013) que permitan continuar hacia el desarrollo de las “ómicas”.

1.5.2. Evaluación de la diversidad

Para entender los principios que gobiernan las comunidades ecológicas se requieren mediciones rigurosas que describan las propiedades de la comunidad, lo cual se puede obtener usando el concepto de diversidad y de estructura de la comunidad. Éstos se relacionan y explican a través de los componentes de la diversidad a tres escalas descritos por Whittaker en 1975 (Hughes, *et al.*, 2001).

Una primera escala se conoce como diversidad local (*alpha*) que es la riqueza específica medida en una localización particular, es el cambio de composición específica a lo largo de un gradiente ambiental o geográfico, por ejemplo: la diversidad de una comunidad microbiana dentro de un solo hospedador. En la segunda escala, la diversidad regional (*gamma*) se describe la riqueza específica de una región, es decir la diversidad de la comunidad microbiana encontrada en una población de hospedadores. Finalmente, la diversidad *beta* que une o relaciona los niveles local y regional, como cambio en la composición de la comunidad a través de las comunidades locales, tal como la diferencia en la estructura de la comunidad de hospedador a hospedador. El estudio de la diversidad *beta* es la herramienta más usada para entender las reglas ecológicas que gobiernan un ecosistema (Robinson *et al.* 2010).

Los estudios de ecología microbiana, basados en técnicas moleculares como pirosecuenciación, permiten estimar la riqueza, diversidad y similitud mediante los métodos basados en taxonomía y los independientes de taxonomía (Cardenas *et al.,* 2009). Los métodos basados en taxonomía son rápidos y permiten clasificar, encontrar secuencias cercanas y detectar taxas entre muestras, basados en la similitud entre las secuencias y las bases de datos, usando algoritmos de similitud (parientes más cercanos o *neighbor-nearest)*, que son parte de herramientas bioinformáticas. Por otra parte, los métodos independientes de taxonomía alinean las secuencias, y basándose en algoritmos de agrupamiento, crean distancias filogenéticas con curvas de rarefacción y Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's por sus siglas en inglés; de igual forma, estas metodologías generan información con la que se estiman índices de diversidad (Cardenas et al., 2009, Angarita, 2013), de acuerdo a los reportes de Monge-Najera y Moreno (2001) y Escalante (1986) puede ser medida a partir de una gran variedad de índices dependiendo el objetivo del trabajo y dentro de estos índices se encuentra:

Riqueza específica (S): número total de especies obtenidas por el censo de una comunidad.

Rarefacción: La rarefacción compara la diversidad observada entre sitios, tratamientos o hábitats que no han sido muestreados equitativamente. Permite hacer comparaciones de números de especies entre comunidades cuando el tamaño de las muestras no es igual. Calcula el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar. Una curva de rarefacción muestra el cambio en el valor esperado de riqueza de especies de acuerdo al tamaño de la muestra. (Ecuación 1-1)

Ecuación 1-1. La rarefacción se calcula por la fórmula

$$E(S) = \sum 1 - \frac{\left(\frac{(N - Ni)}{n}\right)}{\frac{N}{n}}$$

Donde, E(S) = número esperado de especies N = número total de individuos en la muestra Ni =número de individuos de la iésima especie n = tamaño de la muestra.

Chao1: Es un estimador no paramétrico del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra. (Ecuación 1-2)

Ecuación 1-2. Índice de Chao1

$$Chao1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

Donde, S es el número de especies en una muestra, a es el número de especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (número de "singletons") y b es el número de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra (número de "doubletons").

Índice de Shannon-Wiener: expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección, asumiendo que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. El índice va de 0 para comunidades con una sola especie hasta valores altos para comunidades con muchas especies, cada una con pocos individuos y la expresión logarítmica S, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos. Se calcula por la ecuación, donde pi es la proporción relativa (área) de cada comunidad dentro del hospedador para este caso, midiendo la diversidad basándose en frecuencias (Ecuación 1-3)

Ecuación 1-3. Índice de Shannon-Wiener

$$H' = -\sum pi \ . \ln pi$$

Índice de Simpson: Este índice manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente relacionado con la importancia de las especies más dominantes y como su valor es inverso a la equidad, la diversidad puede calcularse como 1 – ʎ. (Ecuación 1-4)

Ecuación 1-4. Índice de Simpson

$$\lambda = \sum pi^2$$

Donde p*i* = abundancia proporcional de la especie *i*; es decir, el número de individuos de la especie ***i*,** dividido entre el número total de individuos de la muestra.

Valor	Interpretación
0.0 – 0.5	Muy baja diversidad o muy alta dominancia
> 0.51 – 0.7	Baja diversidad o alta dominancia
> 0.71 – 0.8	Diversidad y dominancia media
> 0.81 – 0.9	Alta diversidad o baja dominancia
> 0.91 – 1.0	Muy alta diversidad o muy baja dominancia

Los cambios en la composición de la comunidad a través de las comunidades locales, es decir, las diferencias de hospedador a hospedador, se pueden estimar por medio del índice de Whittaker como parámetro de la diversidad beta (β), presentando variaciones entre hospedadores cuando su valor es diferente de cero (0).

En general, toda la información obtenida (basada o no en la taxonomía) busca aproximarse hacia la clasificación de la comunidad, encontrar los parientes más cercanos y comparar las comunidades. La investigación reciente indica que los rumiantes y sus microbiota intestinal han coevolucionado mientras se adaptan a su entorno climático y botánico (McSweeney & Mackie, 2012). Específicamente para los microorganismos metanogénicos del rumen, en las últimas décadas, gran parte del esfuerzo se ha enfocado hacia una descripción de la estructura de la comunidad por medio de análisis filogenéticos (Janssen y Kirs, 2008; Whitford *et al.* 2001; Wright, *et al.* 2006) y comparar estas poblaciones en función de características dietarias o ambientales, así como la eficiencia nutricional (Mohammed *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2009; 2011). Estas estrategias estan dirigidas a mejorar el rendimiento de los rumiantes y el control de las emisiones de gases de efecto invernadero alterando la metanogénesis ruminal, y todo esto depende en gran medida de la comprensión de la ecología y el metabolismo de los metanógenos ruminales. Los estudios de metanógenos ruminales son un reto debido a la naturaleza dinámica del ecosistema ruminal y todavía necesarios, ya que proporcionan una primera selección de las muestras recogidas antes de los análisis exhaustivos. Las tecnologías SPG recientemente desarrollados pueden aplicarse a las muestras de interés para comprender la importancia de los metanógenos y los mecanismos fundamentales de cómo afectan las emisiones de CH_4. (Zhou *et al.*2011).

2. Materiales y métodos

2.1. Localización de los experimentos

Los experimentos (*in vitro* e *in vivo*) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición animal, del Centro de investigación de Biotecnología y Bioindustria (C.I. CBB) y en el programa comercial "Ganado de leche", de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Tibaitatá, ubicada en el Km 14 vía Mosquera (Cundinamarca), con altitud de 2650 msnm y temperatura media de 14°C

2.2. Material biológico

Como sustrato para la fermentación se utilizó la gramínea Kikuyo (*Penisetum cladestinum*) de 45 días de crecimiento y colectado en el C.I. Tibaitatá de Corpoica, el cual fue secado, molido y tamizado a un tamaño de partícula de 1mm.

En cuanto al AEO utilizado, este fue obtenido a partir de plantas orégano nativo (*Lippia origanoides*) con alto contenido en timol (72,3%) (Tabla 2-1) recolectados en el Alto Patía de las veredas Alto de Mayo, San Juanito y Las Juntas-Viento Libre ubicadas en los municipios de Taminango en el Norte del departamento de Nariño y Mercaderes al Sur del Cauca y extraídas por el método de hidrodestilación.

Tabla 2-1. Composición del AEO proveniente de la planta *Lippia origanoides*

Planta de Orégano	Composición					
	Carvacrol	Timol	p-Cimeno	γ-Terpireno	Compuestos entre 1,0 y 4,0%	Compuestos menores al 1%
Lippia origanoides	1,1	72,3	7,7	3,6	8,3	5,4

Fuente: Vásquez, 2011. *Los compuestos entre el 1,0 y el 4,0 % son: trans-β-cariofileno, α-humuleno, timol metiléter, terpinen-4-ol y acetato de timilo. **Los compuestos con una concentración ≤1,0 % son α-pineno, β-mirceno, α-felandreno, γ-3-careno, α-terpineno, limoneno, β-felandreno, eucaliptol, trans-β-ocimeno, cis-hidrato de sabineno, terpinoleno, linalool, trans-hidrato de sabineno, umbellulona, cis-α-bergamoteno, γ-muuroleno, viridifloreno, sesquiterpenol, β-bisaboleno, óxido de cariofileno y epóxido II humuleno (Tomado de: Nuñez, 2011).

El inóculo microbiano empleado fue fluido ruminal, tomado a partir de bovinos canulados de raza Holstein, bajo condiciones de pastoreo con *Pennisetum clandestinum*, sal mineralizada y agua a voluntad. El contenido ruminal fresco fue filtrado y mantenido bajo condiciones de anaerobiosis y a una temperatura de 37°C, y el filtrado se dispuso como inóculo para la fermentación.

2.3. Experimento 1: Evaluación bajo condiciones *in vitro* del efecto del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides*) sobre la degradación de la fibra y la producción de metano (CH_4) por los microorganismos del rumen.

2.3.1. Técnica de producción de gas total *in vitro*

Para la evaluación *in vitro* del efecto del AEO como modulador de la fermentación ruminal, se evaluó: la producción de gas total, la degradación del sustrato mediante la determinación de materia seca (DIVMS) y producción de CH_4; bajo las condiciones anaerobias, en términos de degradabilidad de sustrato y crecimiento microbiano (producción de gas y producción de CH_4, usando la técnica de producción de gas total *in vitro* (Theodorou *et al*. 1994)

- **Medio de cultivo:**

El medio de cultivo empleado fue el descrito por Goering and Van Soest (1970), éste contiene caseína como fuente de proteína, solución buffer (35 g NaHCO3,4 g(NH4)HCO3 L−1), solución macromineral (5.7 g Na_2HPO_4,6.2 g $KHPO_4$,0.6 g $MgSO_4.7H_2O$L−1) y solución micromineral (13.2 g $CaCl_2.2H_2O$, 10 g $MnCl_2.4H_2O$, 1 g $CoCl_2.6H_2O$, 0.8 g $FeCl_2.6H_2O$) agua destilada, rezasurina como indicador del potencial redox y HCL cisteína como agente quelante del oxígeno residual.

El montaje del medio se realizó de acuerdo a Pell y Schofield (1993), en botellas de 50mL, ajustando la fracción liquida a un volumen final de medio de 20mL, con una relación de medio 4:1 con el inóculo (Fluido ruminal) y 0.2 gr de sustrato (kikuyo) por botella, manipulado bajo condiciones de anaerobiosis y con cierre hermético cerradas para garantizar la anaerobiosis y esterilidad del sistema..

2.3.2. Montaje de la fermentación

Se determinó la producción de gas total y de CH_4 a partir de fermentaciones anaerobias *in vitro* (tres repeticiones en el tiempo) (Theodorou *et al.* 1994), llevadas a cabo en una incubadora (Memmert IND400, Alemania) a 39°C, con agitación constante de 100 rpm por un periodo de 48 horas (Figura 2-1.a). Los muestreos de producción de gas se realizaron en los tiempos 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas post-inoculación donde el volumen de gas (mL) producido en cada muestreo, fue cuantificado empleando una jeringa conectada a un transductor de presión manual (TPM) (Figura 2.1.b), y el volumen de gas fue colectado en tubos al vacío de 7 mL para posterior cuantificación de la concentración de CH_4 mediante cromatografía de gases (Makkar 2001). (Figura 2-1.c). con detector FID (Flame Ionization Detector) usando el cromatógrafo Shimadzu 20-14 con nitrógeno grado cromatográfico como gas de arrastre y con tiempo de retención aproximados de 4 minutos, bajo la metodología del laboratorio de nutrición animal del C.I. CBB-CORPOICA Tibaitatá

a. b. c.

Figura 2-1. Fermentación in vitro: a. Botellas con cierre hermético con cada uno de los niveles de inclusión a 39°C. b. Sistema de medición de volumen y presión de gas in vitro y c. Toma de muestra de gas en tubo vacutainer para cuantificación de metano.

Para la degradabilidad in vitro de la materia seca (DIVMS), se determinó al final de la fermentación (48 horas) por método gravimétrico.

2.3.2.2.3.3. Diseño del experimento

Dentro del ensayo se utilizaron los siguientes niveles de inclusión de AEO en diferentes concentraciones expresados en ppm: Nivel 1 (N1): 0 (control sin inclusión de AEO), Nivel 2 (N2):10, Nivel 3 (N3):25, Nivel 4 (N4):50, Nivel 5 (N5): 75 y Nivel 6 (N6): 100 ppm respectivamente, y se manejaron los siguientes blancos: blanco 1 (B1), botellas con medio de cultivo e inóculo de fluido ruminal sin sustrato, blanco 2 (B2), donde hay sustrato, medio de cultivo y como inóculo agua estéril, como control de esterilidad del medio de cultivo.

2.3.3.2.3.4. Análisis estadístico

Para seleccionar el nivel de inclusión, la producción de gas acumulada se modelo matemáticamente a través de funciones no-lineales, utilizando, como criterio estadístico para selección del modelo que mejor se ajuste a las diferentes trayectorias, coeficiente de determinación y el cuadrado medio del error. El modelo seleccionado fue ajustado usando el procedimiento NLIN de SAS, empleando el algoritmo Marquardt. Se realizó un análisis estadístico de los parámetros de la ecuación no-lineal de Gompertz modificada (Ecuación 2-1) (Sakomura *et al.* 2005) descrita como:

Ecuación 2-1. Ecuación no lineal de Gompertz

$$Y = a * \exp(-\exp(b - c\,t))$$

Donde **Y** es el gas o metano total producido en mL (GT o $GTCH_4$ respectivamente), **a** es la asíntota o máxima producción de gas en mL/200mg MS, **b** es el Coeficiente de la fase ascendente, **c** es el Coeficiente de la fase descendente , **t** es el tiempo (h) y la Max producción (b/c): es el momento de máxima producción de gas en horas.

Cuando el efecto del nivel fue significativo se realizó una comparación de medias por Tukey, evaluando el efecto del nivel de inclusión sobre los parámetros estimados de Gompertz en función de la producción de gas, con un alfa del 5%. Diseño de bloques completos al azar, utilizando el procedimiento GLM de SAS.

$$Yij = M + Bi + Tj + eij$$

Dónde:

Yij = Parámetros estimados por Gompertz;
M = Media general;
Bi = Bloques (3 repeticiones)
Tj = Tratamientos (6 niveles)
eij = Error dentro de los tratamientos

2.4. Experimento 2: Determinación de la actividad moduladora del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) sobre el ecosistema ruminal y su impacto en las emisiones de metano entérico de bovinos bajo condiciones de trópico alto Colombiano:

2.4.1. Localización del experimento

Este experimento fue llevado a cabo en el Centro de Investigación CORPOICA-Tibaitatá, en el programa comercial “Ganado de leche”, ubicado a 2516 msnm, a temperatura media de 14 °C, humedad relativa del 76% y una precipitación anual de 20 a 24 mm.

2.4.2. Animales experimentales

Se usaron cuatro (4) novillas de raza Holstein con un peso de 300 ± 4,5 Kg. y una edad promedio de 12,5 meses. Los animales permanecieron en condiciones de confinamiento en corrales individuales con dimensiones de 3 x 3 x 1,6 m de ancho, largo y alto, respectivamente. (Figura 2-2)

Figura 2-2. Novillas de raza Holstein en corrales individuales

2.4.3. Dieta

Se evaluó el efecto de la inclusión de AEO en una dieta basal de 83% heno de Kikuyo *(Pennisetum clandestinum*), 17% de un suplemento del cual: 62% correspondió a concentrado comercial para novillas, 29% de torta de soya, 5% melaza y 4% sal mineralizada. La oferta de alimento se estableció de acuerdo con los requerimientos de mantenimiento y crecimiento de las novillas, usando las tablas de composición del *National Research Council* (NRC) 2001. El forraje, fue proporcionado en tres raciones al día, mientras que el suplemento que incluye el AEO fue suministrado en la primera y última ración del día. El consumo diario de materia seca se realizó por diferencia entre la oferta y el rechazo. Los tratamientos fueron distribuidos como: Tratamiento 1 (T1): con la inclusión de AEO y tratamiento 2 (T2): sin AEO. (Tabla 2.2)

Tabla 2-2. Identificación de los animales experimentales, peso inicial (Kg), períodos de muestreo y tratamiento usado.

No. Id animal	Peso inicial (kg)	Muestreo inicial	Primer periodo	Segundo periodo
1116	306	SIN AEO	SIN AEO	CON AEO
1122	310	SIN AEO	CON AEO	SIN AEO
1126	276	SIN AEO	CON AEO	SIN AEO
1128	282	SIN AEO	SIN AEO	CON AEO

2.4.4. Evaluación de las emisiones de metano in vivo usando la técnica del politúnel

Para la evaluación de emisiones de CH_4 *in vivo* se utilizó la técnica del politunel (Johnson and Johnson, 1995) adaptado por Angarita y González 2007. La técnica del túnel se aplicó teniendo en cuenta las recomendaciones de Murray *et al.* 2001, usando dos cámaras y la preparación previa del terreno para montar los corrales, donde luego se procedió a conducir los animales al corral. Acá se realizó el depliegue del túnel (carpa inflable) a un costado del corral, con la instalación del respectivo motor inflador, que tras ser encendido se procedio a colocar la carpa sobre los animales, y paso seguido, se realizó la instalación de la campana de aspiración en la ventana posterior, que fue sellada y cerrada.

El diseño corresponde a un túnel en el cual las paredes laterales son de tipo inflable similar a una carpa, consta de una cámara o compartimiento cerrado de 7 m de largo, 5 m de ancho y 2.6 m de alto, para un volumen de 83,5 m^3; en forma de túnel fabricado con un material impermeable, inflable, que presenta una entrada a la cámara para los animales y el personal, en el otro costado posee una ventana de 50 cm de diámetro, donde se colectaron las muestras del aire cada hora fijada. (Figura 2-3)

Figura 2-3. Montaje de la técnica del túnel y animales dentro de la carpa

Para evaluar la producción de CH_4 in vivo se tomaron muestras de aire cada hora durante las 72 horas, en la hora correspondiente al muestreo. El aire que sale del túnel fue colectado con una jeringa, y luego introducido en un tubo tipo en condiciones de vacío con un volumen de 7 mL. (Figura 2-4) Las muestras, fueron almacenadas a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco (Murray *et al.* 2007), hasta el posterior análisis de la determinación de la concentración de CH_4 por cromatografía de gases.

Figura 2-4. Toma de muestra de aire del túnel para cuantificación de metano

Al final del periodo de muestreo, se determinaron los cambios en parámetros de fermentación ruminal, a partir de fluido ruminal fresco, colectado mediante sonda oro-ruminal (Martín *et al.*, 2005). El pH fue medido con un potenciómetro marca ORION RESEARCH digital pHmeter modelo 011, y la concentración de nitrógeno amoniacal fue cuantificada por el método colorimétrico de espectrofotometría de fenol-nitroprusiato (Bonmatí *et al*, 1985), y el contenido de AEO fue cuantificado como equivalentes de timol presente en el rumen por HPLC y detección UV.

Adicionalmente, se realizó la evaluación periódica de parámetros ambientales (humedad relativa y la temperatura ambiental), fisiológicos (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura rectal) y de comportamiento a cada uno de los animales, tales como peso (peso inicial y final de cada animal), el consumo de materia seca, calculado por la diferencia de peso entre el alimento ofrecido y el rechazado, que fue recogido y pesado todos los días.

También las variables ambientales y fisiológicas de los parámetros de los índices de adaptabilidad (IA), que tiene en cuenta el valor de la temperatura rectal y de la frecuencia respiratoria del animal en los momentos de máxima radiación (Benezra en 1954); el índice de temperatura y humedad (ITH) dentro de los túneles, índice que ha sido muy utilizado por investigadores para valorar los efectos de ambientes cálidos y húmedos en humanos y animales. El ITH indica la respuesta de un animal a la temperatura y a la humedad relativa del ambiente, así como también la importancia de los componentes calóricos (Xin *et al.* 1992). Estas variables fueron evaluadas durante los días de muestreo de CH_4, cuantificadas con unos Termohigrómetros, previamente programados e instalados a los costados de cada corral, midiendo automáticamente en las horas establecidas, la temperatura y la humedad relativa, y analizados con el programa EXTECH, (Parra y Ávila, 2010) con el fin de tener referencia de las condiciones microclimaticas que se forman dentro de la cámara cerrada.

Las muestras de contenido ruminal (CR) se obtuvieron mediante sonda oro-ruminal (Martín *et al.* 2005) para cada uno de los animales que tuvieron los tratamientos, las cuales fueron tomandas en el último día de cada periodo experimental. Las muestas

colectadas fueron distribuidas en en tubos de plástico estériles de 50mL, cerradas herméticamente y almacenados en refrigeración de acuerdo al análisis a realizar: parámetros fermentativos, (almacenato a 4ªC) actividad enzimática (almacenado a -20ªC) y análisis moleculares (almacenado a -20ªC), para su posterior procesamiento.

2.4.5. Diseño Experimental y Análisis estadísitico

El diseño experimental corresponde a un modelo de sobre-cambio o cross-over simple, distiribuido en dos periodos de 10 días cada uno, con siete (7) días iniciales de acostumbramiento a la dieta y al confinamiento y tres (3) días de mediciones de CH_4 utilizando las carpas o túneles, siendo la fase del inicio del experimento una covariable de los tratamientos. El último día se realizó el pesaje y sondeo para obtener muestras de fluido ruminal de cada animal, por cada período y tratamiento.

El modelo se describe como:

$$Yij = \mu + \tau i + SUBj + \varepsilon ij,$$

Donde:

Yij = observación en el animal o sujeto j en el tratamiento i, con i = dos tratamientos y j = dos animales por túnel,
μ = la media general,
τi = el efecto fijo del tratamiento i,
SUBj = el efecto aleatorio del sujeto (animal) j con media 0 y varianza σ2,
εij = error aleatorio con media 0 y varianza σ2**.**

2.4.6. Evaluación de la actividad fibrolítica de la comunidad microbiana

Para este análisis, el CR fue alamcenado a -20ªC, y descongelado a 4ªC. Ya en estas condiciones fue sometido a cuatro ciclos de sonicación por 30s y enfriamiento a 4°C entre cada ciclo, posteriormente fueron centrifugadas a 15000g por 20 minutos a 4°C. (Mayorga, 2009). A partir del sobrenadante del CR se realizó la estimación de las actividades enzimáticas. Se contemplaron los procedimientos referenciados para cada una, con la previa estandarización a las condiciones del laboratorio empleando el método de determinación de azúcares reductores de Somogyi (1952). Estos análisis de actividad enzimática se realizaron para enzimas específicas: xilanasa y CMCasa, para cada una de las muestras.

- **Actividad Endo -1,4-β-glucanasa:** La actividad celulolítica Endo -1,4-β-glucanasa se determinó a través de la medición de azúcares reductores liberados en el sobrenadante de las muestras, a partir del substrato carboximetilcelulosa (CMC) usando el método reportado por Zhu *et al.* 1996. Las determinaciones se realizaron por triplicado

utilizando 250 µL del sobrenandante de CR y 750 µL de sustrato [0.6% (p/v) de CMC-sal de sodio, viscosidad baja (C-5678 de Sigma® y co.), en buffer fosfato, pH 6.5]. La mezcla de reacción fue incubada a 39 °C durante una hora. Una vez finalizada la incubación se midieron los azúcares reductores liberados empleando un espectrofotómetro lector de placas Bioteck® y se leyó a la absorbancia del complejo cobre-azúcar-arsenomolibdato a 540 nm.

Las curvas estándar para azúcares reductores liberados se obtuvieron por la reacción de 250 µL de una solución estándar y 750 µL de sustrato (curva de actividad) o buffer fosfato (curva de blancos). Las soluciones estándar contenian glucosa (G-5767 de Sigma® y co.), en agua destilada desionizada para alcanzar concentraciones conocidas por cada punto de la curva de 0, 8, 16, 24, 32 y 40 ppm. La glucosa neta liberada de la CMC por las CMCasas se define como la cantidad de glucosa en las curvas de actividad de muestras, menos la glucosa presente en las curvas de blancos de muestras.

- **Avtividad Endo-1,4-β-xilanasa:** La actividad xilanolítica se determinó por medición de azúcares reductores liberados en el sobrenadante de las muestras a partir de xilano de madera de abedul tipo Birchwood (X-0502 de Sigma® y co.), como substrato, siguiendo el método de Zhu et al. 1996. Las determinaciones se realizaron por triplicado utilizando 150 µL del sobrenandante de CR y 450 µL de substrato [0.66% (p/v) de xilano tipo Birchwood en buffer fosfato, pH 6.5]. La mezcla de reacción fue incubada a 39 °C por 30 minutos. Una vez finalizada la incubación los azúcares reductores liberados fueron medidos con el mismo procedimiento utilizado para la determinación de la actividad celulolítica, pero utilizando como solución estándar xilosa en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 400 ppm.

Las diferentes actividades enzimáticas se expresaron en Unidades Internacionales (UI), donde una UI es la cantidad de µmoles de azúcares reductores liberados min./mL de producto enzimático no diluido, bajo las condiciones del ensayo como lo proponen Colombatto y Beauchemin (2003).

2.4.7. Evaluación molecular de las poblaciones Metanogénicas

Los análisis moleculares fueron realizados en los laboratorios de Nutrición Animal y en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal del Centro de investigación de Biotecnología y Bioindustria (C.I. CBB), de Corpoica

2.4.7.1. Extracción y amplificación del ADN

La extracción del ADN se realizó basada en los protocolos descritos por Yu y Foster (2005) en el libro "*Methods in gut microbial ecology for ruminants"* (H.P.S: Makkar, 2005). Usando una técnica de extracción directa, por medio de tres pasos: (i) lisis celular para

liberar el ADN/ARN, (ii) separación del ADN/ARN por manipulación enzimática, precipitación o con matriz sólida y (iii) la recuperación del ADN/ARN.

A partir del CR colectado y almacenado a -20°C en tubos tapa rosca plásticos, fueron sometidos a proceso de liofilización y macerado. De este producto se pesaron 100 mg de cada muestra, transferidos a tubos para microcentrífuga de 2 mL, los cuales contenian 0.25 g de perlas de vidrio (diámetro de 1 mm) estériles. A cada tubo luego se le adicionó 1000 µL de buffer de lisis (2% SDS, 100 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, 200 mM NaCL), 100 µL de solución de acetato de potasio y 100 µL de agua grado molecular, y se agitó la suspensión para homogenizar en un Mini Bead-Beater-8 (Biospec MMB-8) por dos minutos a 4000 rpm durante 2 minutos, y posterior lisis por choque térmico, las muestras se sumergen rápidamente en nitrógeno líquido (-195°C) y agua en ebullición (100°C), seguido de agitación mecánica por 4 minutos en Mini Bead-Beater, este paso se realizó dos veces. El material fue centrifugado a 13000 rpm a 4 °C y 15 minutos, del sobrenadante obtenido se transfieren 300 µL a un nuevo tubo, y se les adicionó 600 µL de una matriz de ligamiento de sílica para el ADN (*Glass milk* - 3M Guanidine Isotiocianato, 5 gramos de silic) a cada muestra e inmediatamente se mezclaron por inversión manual durante 5 minutos. Después se centrifugaron a 10000 *g* durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 500 µL de etanol frío al 70%, para retirar residuos como proteínas, ácidos orgánicos y carbohidratos que afectan la calidad del ADN y se agitó en vortex hasta homogenizar, y posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10000 *g* durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante, seguidamente se dieron varias centrifugaciones para retirar el etanol residual por evaporación. Los tubos con el pellet adherido se dejaron secando por inversión sobre papel absorbente limpio durante toda la noche. En el día siguiente se resuspendió el pellet formado con 100 µL de agua ultra-pura grado molecular®. El ADN se almacenó inmediatamente después a 4°C para cuantificación y dilución de soluciones de trabajo, mientras que el stock de ADN fue alamcenado a -20°C.

La calidad del ADN se determinó por cuantificación con nanoespectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 versión 3.3. (Wilmington, Delaware, Estados Unidos) a una longitud de onda de 260 nm en concentraciones de ADN por encima de 50 ng/µl. La pureza del mismo se estimó partir de la relación entre la absorbancia 260/280 nm, siendo el óptimo un rango de 1.8 a 2.0. El ADN se diluyó a una concentración de 50ng/µL para los posteriores análisis moleculares.

2.4.7.2. Pirosecuenciación de amplicones etiquetados para metanógenos totales

Para evaluar la diversidad en términos de riqueza y estructura de la comunidad de *Archaeas* metanogénicas, a partir del ADN del contenido ruminal de novillas de raza Holstein bajo los tratamientos descritos en la tabla 2.2, se procedió a hacer la

pirosecuenciación. Doce iniciadores fueron seleccionadas para evaluar poblaciones, para tal fin se diseñaron los cebadores del gen *mrcA* (metil coenzima-M reductasa) de la subunidad pequeña 16S del ARNr, descritos como MT-F (metanógenos totales Forward) y MT-R (Reverse), Met86F, con secuencia (GCTCAGTAACACGTGG) y Met915R (GTGCTCCCCCGCCAATTCCT), referenciado por Zhou *et al.* 2010

Los doce (12) cebadores etiquetados o TAG, tienen unido al inicio de su secuencia un adaptador-GCCTCCCTCGCGCCATCAG- diseñado para utilizarse durante el proceso de pirosecuenciación como sitio de unión a las esferas de amplificación, el diseño de los iniciadores (Figura 2-5.).

Figura 2-5. Diseño de los iniciadores empleados para el análisis de 454 pirosecuenciación**.**

Forward (39 pb)

F- Adaptador (19 pb secuencia fijada)	Tag identificador (4 pb secuencia variable)	Target- secuencia específica (Iniciador Met86F -16 pb)

Reverse (39 pb)

F- Adaptador (19 pb secuencia fijada)	Target- secuencia específica (Iniciador Met915R -20 pb)

Las etiquetas en los cebadores permiten la identificación de las muestras, y la muestra corresponde al ADN obtenido de cada uno de los cuatro (4) animales de los que se colecto CR en cada uno de los periodos (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Asignación de los iniciadores empleados en la pirosecuenciación de acuerdo a los tratamientos, animales y periodos experimentales.

Periodo	Código muestra	No. ID Animal	Nombre del oligo	Secuencia 5' - 3'
INICIAL	1	1116	MTF86 –TGAC	GCC TCC CTC GCG CCA TCA G TG AC GCTCAGTAACACGTGG
	2	1126	MTF86 –GTCA	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GGT CAGCTCAGTAACACGTGG
	9	1122	MT-F86 CTCG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCT CGGCTCAGTAACACGTGG
	12	1128	MT-F86 CATC	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TCGCTCAGTAACACGTGG
1	8	1116	MT-F86 CACT	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA CTGCTCAGTAACACGTGG
	5	1126	MT-F86 CATG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCA TGGCTCAGTAACACGTGG
	3	1122	MTF86 –GCTA	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GGC TAGCTCAGTAACACGTGG
	4	1128	MTF86 ACTG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC TGGCTCAGTAACACGTGG
2	10	1116	MT-F86 TAGT	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GTA GTGCTCAGTAACACGTGG
	11	1126	MT-F86 GATC	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GGA TCGCTCAGTAACACGTGG
	6	1122	MT-F86 TCGA	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GTC GAGCTCAGTAACACGTGG
	7	1128	MT-F86 CTAG	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GCT AGGCTCAGTAACACGTGG
PARA TODOS			MT-R915	GCC TTG CCA GCC CGC TCA GGTGCTCCCCCGCCAATTCCT

La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen final de 15 µL y contenía: 1,25 µL de buffer 10X, 0,25 µL de BSA 20X, 0,25 µL de MgCl2 50 mM, 0,25 µL de dNTPs mix 10 mM, 0,1 µL de Taq polimerasa (5 U/µL), 0,25 µL de cada iniciador en una concentración de 10 µM y 9,4 µL de agua grado molecular y 3 µL del ADN extraído, ajustado a una concentración de 50 ng/µL. Las condiciones del programa usado para la amplificación se basaron en el trabajo de Zhou *et al.* 2010, con una denaturación inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos para el anillamientos con 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto y con una elongación final de 7 minutos a 68°C.

La verificación de la amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2,0% (0,6 g de agarosa disuelta en 30 mL de TAE 1X (Tris-acetato EDTA) y sometida a calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición, luego se adicionó 0,3 µL de Bromuro de etidio para tinción del gel antes de servir en cámara, se emplearon 4 µL de un marcador de peso molecular de 1Kb (Bioline®). La corrida electroforética se realizó a

180V durante 30 min, utilizando TAE 1X (Tris-acetato EDTA) como buffer de corrida. Los geles se visualizaron en equipo documentador de imágenes marca Syngine®

La limpieza y concentración de los amplímeros obtenidos por PCR convencional, fueron cuantificados en un con nanoespectrofotómetro NanoDrop® ND- 1000 versión 3.3. y purificados empleado un kit comercial, el QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen®, tras la limpieza el ADN fue cuantificado nuevamente, y ajustado cada producto a una concentración fija de 400 ng, finalmente los volúmenes ajustados, fueron mezclados en un vial, y concentrados en un DNA-100 Speed Vac marca Savant®, obteniendo el ADN para ser enviadas para el proceso de pirosecuenciación.

La pirosecuenciación de los amplímeros concentrados se procesaron en el laboratorio de Inqaba Biotechnical Industries (Pty) Ltd (Hatfield, South Africa, http://www.inqababiotec.co.za/new) usando la plataforma 454 - GS FLX Titanium, de Roche.

2.4.7.1.2.4.7.3. Procesamiento y análisis bioinformático de secuencias

Para el procesamiento y la asignación taxonómica de las secuencias, el control de calidad y los análisis de asignación taxonómica se realizó en primaria instancia con BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), realizando de manera manual la remoción de los cebadores con sus respectivas etiquetas en un archivo multi-FASTA y las secuencias con longitud menor a 80 pb no se consideraron para análisis posteriores. Una vez limpios los metagenomas para el análisis taxonómico de las secuencias se utilizó la herramienta *Classifier* del RDPipiline (Version 2.6) del Ribosomal Database Project (RDP Release 11, Update 1) para generar las correspondientes asignaciones taxonómicas por jerarquía taxonómica basado en el manual de Bergey, con un nivel de confianza del 80% (Cárdenas *et al.* 2009; Q. Wang *et al.,* 2007).

Las secuencias, también fueron procesadas y analizados utilizando el software QIIME de la versión 1.8.0. El control de calidad y análisis de datos se realizaron con QIIME pipeline (Caporaso, *et al.* 2011). Con los archivos de las secuencias en formato sff se crearon archivos en formato fasta y qual, tras este proceso se creo el archivo de asignación el cual posee la información necesaria acerca de cada muestra, que incluye: Identificación de muestra (ID), la secuencia fija o “barcode” e identificadora “tag” utilizada para cada muestra, la secuencia de los primers empleados en la amplificación y una columna con la descripción general. A partir de estos archivos se realizó el filtrado de secuencias basado en la longitud (200 pb/1000 como máxima) y el nivel de calidad (mínimo empleado = 25) eliminando por defecto bases ambiguas, seguido de la asignación taxonómica mediante el comando *split_library.py* y alineamiento de las secuencias obtenidas para definir las unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Los datos se agruparon en OTUs

compartiendo más de un 97% de similitud de secuencia. (Sun, *et al.* 2011) Las secuencias fueron asignadas a los grupos filogenéticos por BLAST del gen 16S rRNA contra la base de datos Greengenes, desde QIIME. Los datos obtenidos se agruparon en las categorías taxonómicas fila, clase, orden, familia y género.

3.4. Resultados

3.1.4.1. Evaluación bajo condiciones *in vitro* del efecto del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides*) sobre la degradación de la fibra y la producción de CH4 por los microorganismos del rumen.

3.1.1.4.1.1. Dinámica de la producción de gas total, DIVMS y metano

Las variables de producción y tasa máxima de producción de gas total se presentan en la Tabla 3-1.

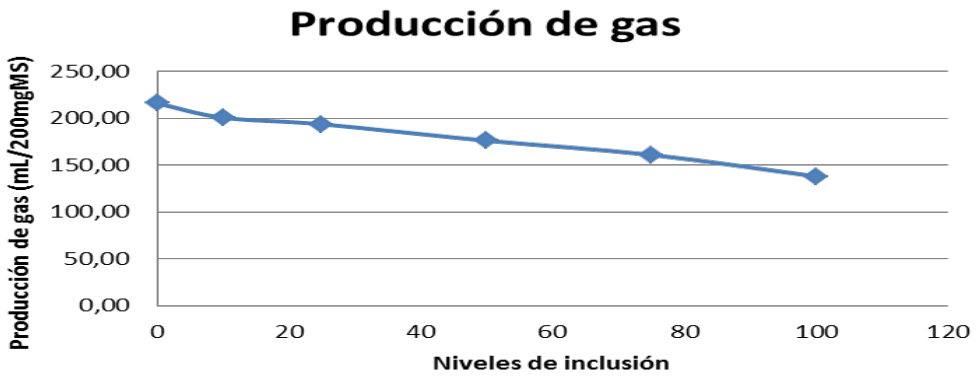
Tabla 3-1. Parámetros de la ecuación de Gompertz (Y= a * exp (- exp (b – c t))) de la producción de gas total a diferentes niveles inclusión de AEO

Tratamientos	a Máxima producción de gas (mL)	b/c Tasa máxima de producción de gas (mL/h)
Control (N1)	216,06	2,58 [a]
10 ppm (N2)	200,71	2,53 [a]
25 ppm (N3)	193,70	2,03 [ab]
50 ppm (N4)	176,25	1,85 [bc]
75 ppm (N5)	161,05	1,80 [bc]
100 ppm (N6)	138,14	1,38 [c]
Valor p	0,0496	<.0001

Los tratamientos representan diferentes concentraciones de AEO manejados como niveles de inclusión (N_n). *Pennisetum clandestinum* (Kikuyo) como sustrato, Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos. Tendencia= t (p<0,1), altamente significativo= p < 0.0001.

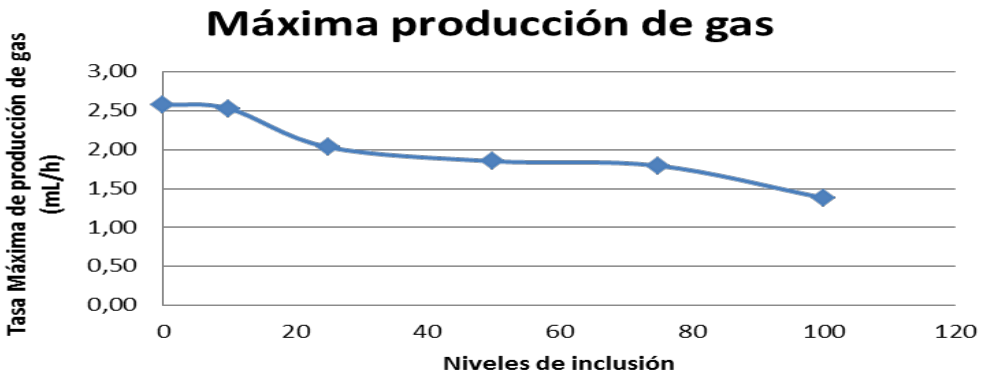
La máxima producción de gas presentó una tendencia (p=0,0496), a mayor nivel de inclusión de AEO la producción de gas disminuye hasta 78 mL en el nivel mas alto de AEO (100 ppm) comparado con el control. El parámetro de tasa máxima de producción de gas mostró diferencias altamente significativas entre los niveles (p<.0001), donde el tratamiento de mayor nivel de inclusión N6, mostró una disminución de 46% (1,38 mL/h) respecto a la tasa reportada en el control (2,58 mL/h). De otra parte, los niveles más bajos de 10 y 25 ppm no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

Sobre estos parámetros se realizó un análisis de regresión (Figura 3-1 a y b), indicando que la producción máxima gas muestra una tendencia lineal negativa (0,0874) asociada al aumento en la inclusión del AEO; de igual forma el análisis de regresión lineal para la relación b/c (Figura 3-1b) evidenció una disminución altamente significativa (p<.0001) en la tasa máxima de producción de gas.



Parámetro	Estimador	Pr > |t|
LINEAL	-2,320	<.0001

a.



b.

Parámetro	Estimador	Pr > |t|
LINEAL	-27.266	0.0874

Figura 3-1. Análisis de regresión para los parámetros fermentativos: a. Máxima producción de gas con tendencia lineal (0,0874) y b. Tasa máxima de producción de gas con regresión lineal y diferencias altamente significativas (p<.0001)

La DIVMS (Figura 3-2), mostró diferencias altamente significativas entre niveles (P<.0001), siendo el único tratamiento con diferencias significativas (P<0.05) con respecto al control el de 100 ppm, mostrando una reducción en la DIVMS de 47.5%.

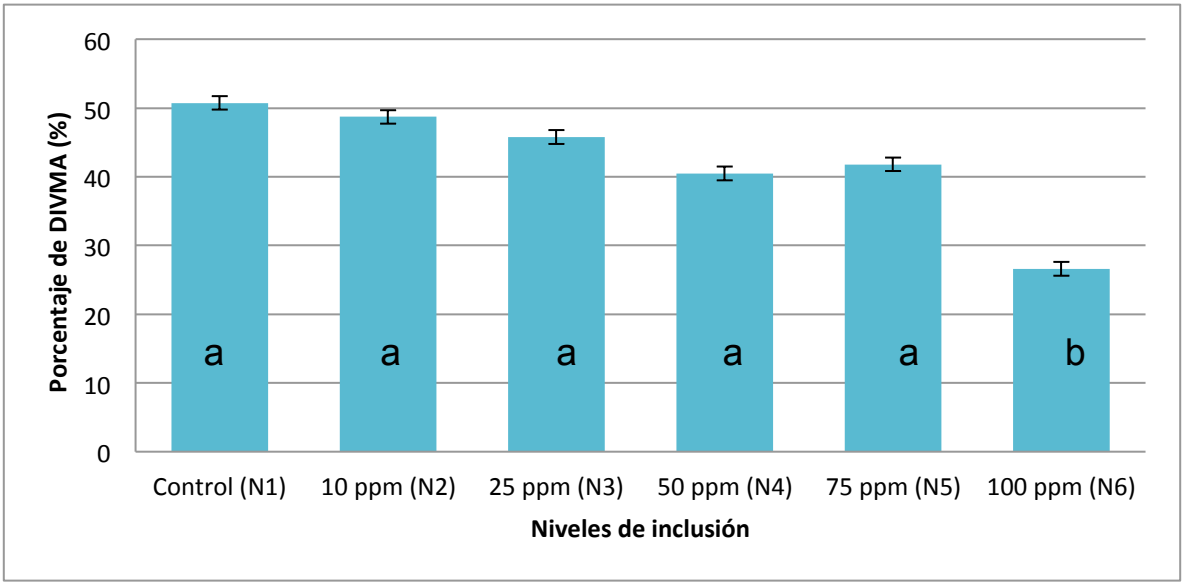


Figura 3-2. Porcentaje de DIVMS diferentes concentraciones de AEO manejados como niveles de inclusión, siendo: con *Pennisetum clandestinum* (Kikuyo) como sustrato, Diferentes letras indican diferencias significativas P < 0.0001.

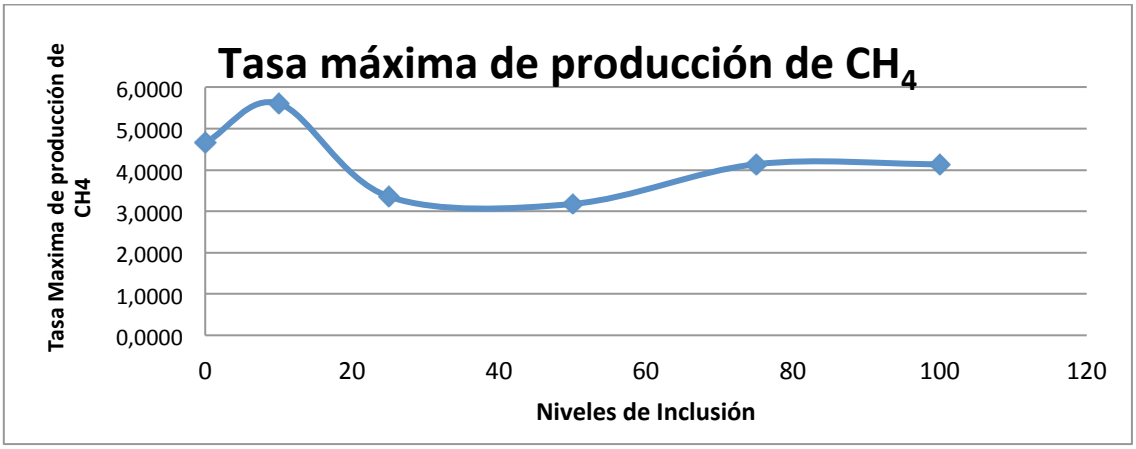
En referencia a la parametrización de la dinámica de producción de metano (Tabla 3-2), el parámetro "a" que indica la máxima producción, no presentóo diferencias significativas entre niveles a pesar de las diferencias numéricas entre ellos; sin embargo, es importante resaltar que durante el análisis de medias de los parámetros, se considero los periodos como bloques, estos presentaron diferencias signficativas (p=0,0195), lo que podría estar asociado a los cambios entre los inoculos microbianos del rumen y/o proporción fase líquida: sólida del fluido ruminal en cada uno períodos experimentales como principal fuente de varianza (Bueno *et. al*., 2005).

Tabla 3-2. **Parámetros de la ecuación de Gompertz (Y= a * exp (- exp (b – c t))) de la producción de CH_4 total a diferentes niveles inclusión de AEO**

Tratamientos	A Máxima producción de CH_4 (mL/gMS)	b/c Tasa máxima de producción de CH_4 (mL/h)
Control (N1)	174,75	4,66 [ab]
10 ppm (N2)	158	5,60 [a]
25 ppm (N3)	150,19	3,35 [bc]
50 ppm (N4)	143,44	3,17 [bc]
75 ppm (N5)	123,11	4,13 [ab]
100 ppm (N6)	70,46	4,13 [c]
Valor de p	0.1345	<.0001

Los tratamientos representan diferentes concentraciones de AEO manejados como niveles de inclusión, con *Pennisetum clandestinum* (Kikuyo) como sustrato. Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas entre tratamientos a P>0.05. NS: No hubo significancia P < 0.0001.

Por otra parte, la relación b/c que refleja la tasa máxima de producción de CH_4 mostro una diferencia altamente significativa (p<.0001) entre los niveles de inclusión de AEO (Tabla 3-2). El análisis de regresión de este parametro (Figura 3-3) mostró que los niveles de AEO en general fueron lineal (p=0,007) y cúbico (p=0,001). La disminución de la tasa de producción de metano fue particularmente marcada entre los niveles de 25, 50, 100 pmm con respecto al nivel 10 ppm de mayor tasa de producción de CH_4, donde se redujo ésta en un 40, 43, 26%, respectivamente.



Parámetro	Estimador	Pr > |t|
LINEAL	-3,567	0.0070
CUBICA	4,288	0.0010

Figura 3-3. Análisis de regresión para el parámetro de tasa máxima de producción de CH_4, con tendencia lineal (p=0,007) y cúbica (p=0,001) con diferencias significativas.

Con respecto a la correlación entre cada uno de los parámetros fermentativos evaluados, se encontraron correlaciones altamente significativas (P<0.0001) entre DIVMS, producción de gas total y producción de CH_4, presentado una correlación positiva (0,9419) entre producción de gas y DIVMS; de igual manera entre producción de gas y producción de CH_4 (0,9620) y producción de CH_4 con relación a la DIVMS (0,9716).

3.2.4.2. Discusión

Analizando el efecto de los diferentes niveles AEO sobre la capacidad de degradación y fermentación de los microorganismos del rumen a nivel *in vitro* y usando kikuyo como sustrato, los resultados mostraron que la DIVMS, la producción máxima de gas y la tasa máxima de producción de gas total disminuyen con el incremento en el nivel de inclusión del AEO, siendo marcado su efecto al nivel de 100 ppm; contrastando, con la respuesta en la tasa máxima de producción de CH_4, donde la disminución de la tasa incluyó además los niveles menores de 25 y 50 ppm. Este ensayo indicaría una inhibición de la actividad degradativa de los microorganismos con la inclusión de AEO a una concentración de 100 ppm, sin embargo a dosis menores esta inhibición de la actividad microbiana no fue evidente. En contraste, la tasa de producción de CH_4 si fue afectada a niveles menores como se indico previamente, lo que sugiere una modulación de la metanogénesis dependiente de la dosis de AEO.

Esta respuesta de inhibición y modulación de los AEO podría estar asociada a la actividad microbiana de estos, ya que como se señalo previamente, el AE de *Lippia origanoides* (Tabla 2-1) tiene como componente principal el timol (72,3%), presente también en especies vegetales como tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgaris*). El timol ha demostrado en varios estudios tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana, dada la inhibición de bacterias gram-positivas y gram-negativas debido a su capacidad para actuar como permeabilizador de membrana celular (Helander *et al* 1998;. Dorman y Deans, 2000; Walsh *et al.* 2003), aumentando su fluidez y perturbando las proteínas incorporadas a la membrana (Trombetta et al. 2005) produciendo la desintegración de la pared celular con la liberación de material citoplasmático al medio externo ante altas dosis (Rasooli *et al.* 2006). De otra parte, el tipo de aceite esencial y las concentraciones en las que se dosifica, afecta la respuesta antimicrobiana, como lo reportado por Oh *et al*. (1967) quienes evaluaron esta actividad sobre *Pseudostuga menziesii* y sus compuestos en una fermentación *in vitro* por 24 horas, usando como inóculo fluido ruminal de ciervos y ovejas; obteniendo con niveles de inclusión de 4 a 8 mL/L de líquido no tenían ningún efecto sobre la fermentación microbiana, pero a mayores niveles de 12 mL/L de líquido se redujo la producción de gas total de la fermentación (Calsamiglia *et al.*2007).

De otra parte, esta respuesta en la inhibición de la actividad degradativa y producción de gas total de los AE asociada a la dosis de inclusión ha sido también reportada por otros estudios, donde se han empleado diferentes AE y CAE, evidenciado el efecto del nivel de inclusión sobre los parámetros de producción de gas, como lo reportado por Kamalak *et al.* en el 2011, quienes manejaron cuatro niveles de inclusión de timol (0, 50, 100 y 200 mg/L) en fermentaciones, encontrando una disminución del 22,77% en el parámetro de máxima producción de gas (56,69 mL) y tasa de producción de gas de 0,080 mL/h, con timol a una concentración de 200 mg/L ($P<0,001$). En este mismo estudio el tratamiento control (sin timol) mostró una producción de gas de 73,41 mL y tasa de producción de

0,113 mL/h, mientras que en el tratamiento con timol a 50 mg/L, se obtuvo una máxima producción de gas de 71.18 mL y una tasa de producción de gas de 0.107 mL/h sin diferencias significativas respecto al control. Benchaar *et al.* 2007, usaron diferentes AE de diferentes plantas, entre ellos orégano, y diferentes CAE, entre estos el timol, a una concentración de 200 mg/L en incubaciones a 24 horas, los cuales dieron como resultado una disminución ($P<0,05$) en la producción de gas en comparación con el control (177 mL/g MS), donde el timol tuvo una máxima producción de gas de 167 mL/g MS, y el AEO mostró un valor de 168 mL/g MS; y en cuanto a la tasa máxima de producción de gas en el control se reportó un valor de 15.8 mL/h y en timol 14.6 mL/h y el AEO 15 mL/h sin diferencias significativas para este parámetro. Patra y Yu en el 2012, trabajaron con diferentes AE, donde el orégano en dosis de 0,25, 0,50, y 1 g/L, reportó en la producción de gas para cada dosis valores de 53, 45,8 y 12,3 mL respectivamente, frente a un control con 59,8 mL. De igual manera, se ha reportado la disminución en la degradabilidad de la MS cuando se adiciona dosis altas de AE y/o sus componentes, como lo presento Benchaar *et al.* 2007, donde la disminución en la producción de gas fue consistente con la reducción de la DIVMS, y cuyo resultado presenta controles con valores de 0.317 y 0.320 g/Kg MS, y los tratamientos con AEO y timol valores de 0.312 y 0.305 g/Kg MS respectivamente, sin embargo el único componente que presentó diferencias significativas fue el carvacrol (0.268 g/Kg MS) el cual fue manejado a una concentración de 400 mg/L. Castillejos *et al*. en el 2006, también reportó la reducción de la digestibilidad de la materia seca con la adición de timol a una concentración de 500 mg/L. En resumen, los AE o CAE, generan un efecto sobre la producción de gas total y degradabilidad asociado al nivel de inclusión, y en la mayoría de los casos adverso cuando es dosificado en altas concentraciones.

En cuanto al efecto sobre la producción de CH_4 por los AEO y su nivel de inclusión, otros estudios también ha reportado un efecto asociado a la dosis de AEO, es así como Patra y Yu, 2012, usando 0,25, 0,50, y 1 g/L de AEO encontró que la producción de CH_4 fue diferente (22,8, 16 y 3,4 mL respectivamente); encontrando que esta disminución esta asociada con la producción de gas, la cual también disminuye, como ya se describió previamente. Macheboeuf *et al.* 2008 usando AEO y CAE a dosis de 1,0, 2,0, 3,0 y 5,0 mmol/L y un control, reportaron una disminución de metano al incrementar la dosis, mostrando diferencias significativas entre el control (0,847 mmol/Lote) y el nivel de mayor concentración (0,025 mmol/Lote). Teniendo en cuenta estos reportes, el manejo de las dosis tanto del AE como de sus componentes, resulta clave en el efecto modulador en la producción de metano, intentando no afectar negativamente la fermentación ruminal.

En este orden de ideas y considerando que uno de los objetivos de este ensayo fue el seleccionador el nivel de dosificación del AEO a ser usado bajo condiciones *in vivo*, se tomaron como criterio de selección aquella dosis que redujera la metanogénesis ruminal sin afectar negativamente la degradación del sustrato. Es así como, la dosis de 100 ppm no fue seleccionado por sus efectos adversos sobre la producción gas y DIVMS. De otra parte el nivel mas bajo 10 ppm, a pesar de no presentar diferencias en degradación frente

al control, mostro la tasa mas alta de producción de metano; mientras que los niveles de 25 y 50 ppm no mostraron un efecto negativo sobre la degradación pero con una tasa de producción de metano menor comparado con el 10 ppm. De otra parte, soportado con información de otros estudios reportados en literatura como el de Wang *et al.* 2009, quienes usaron AEO Ropadiar, en concentración de 250 mg/día sobre una dieta basal de 1.29 Kg en ovejas mostró un potencial inhibidor de la metanogénesis sin efecto sobre la degradación. Revisiones como las Patra, 2011 y Benchaar, 2007, sugieren que el uso de dosis intermedias de los AE y componentes pueden tener un efecto modulador en la metanogénesis con respuestas positivas en la fermentación , por lo tanto a partir de esta información se decidió emplear una concentración de 25 mg/Kg de MS de AEO para el ensayo *in vivo.*

3.3.4.3. Determinación de la actividad moduladora del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) sobre el ecosistema ruminal y su impacto en las emisiones de metano entérico de bovinos bajo condiciones de trópico alto Colombiano

3.3.1. Respuesta y condición animal por inclusión con AEO

En la tabla 3-3 se muestra los resultados de ganacias diarías de peso y consumo para los animales cuando fue adicionada a la dieta AEO y sin AEO, de igual forma se muestra el contenido de AEO (como equivalentes de timol) en el rumen al final del periodo experimental.

Tabla 3-3. Ganancia de peso y consumo de novillas Holstein durante la adición y no adición del AEO en una dieta basal de kikuyo

ID ANIMAL	Ganancia de Peso con AEO (Kg/día)	Ganancia de Peso sin AEO (Kg/día)	Consumo con AEO (Kg/animal/día)	Consumo sin AEO (Kg/animal/día)
1122	-0,40	1,8	7,1	7,9
1126	1,0	2,0	7,5	8,2
1128	1,6	1,5	7,9	7,1
1116	1,8	0,4	7,5	7,1
Media	0,62	1,80	7,50	7,57
Media General ± MSE	1,21±0,625		7,53 ± 0,145	
Valor P	0,1173		0.5425	

La ganancia de peso equivalente a Kg/día no se encontraron diferencias significativas (p=0.1173) entre tratamientos, sin embargo, la novilla identificada con el número 1122

presentó la menor ganancia de peso (-0,4 Kg), asociado principalmente a su comportamiento, ya que manifestó mayor susceptibilidad temperamento al estrés del manejo durante todo el ensayo. En cuanto al consumo de materia seca no se presentaron diferencias significativas (p=0.5425) entre tratamientos, con un consumo promedio de 7,5 Kg/animal/día con y sin AEO para las novillas confinadas en los polituneles.

Por otra parte, tras la adición del AEO a las dieta de las novillas se verificó el contenido de AEO mediante la cuantificación de equivalentes de timol presente en el rumen, se encontrarón ron concentraciones de timol en el contenido ruminal, encontrando valores de 2,69 µg/L para la novilla 1122, 4,56 µg/L para la 1126, 4,95 µg/L para la 1128 y de 2,00 µg/L para la 1116, sin embargo, este principio activo no se detectó en los períodos donde los animales no eran dosificados con AEO.

Las condiciones ambientales y de bienestar animal durante el ensayo fueron evaluadas mediante el índice de adaptabilidad, de temperatura y humedad (ITH) dentro de los túneles descritos en la Tabla 3-4. Estas condiciones ambientales y de bienestar animal evaluados a través de los índices de temperatura y humedad (ITH) e índice de adaptabilidad (IA) durante los días de muestreo de metano, según lo reportado por Benezra (1954), valores de IA por encima de 2.79 para la raza Holstein indican estrés térmico por el incremento en la frecuencia respiratoria y/o la temperatura rectal.

Durante los dos periodos experimentales, se presentaron cuatro (4) casos de estrés térmico reflejado en las variables animales, un caso en el final del primer periodo y coincidiendo con las variables anteriormente mencionadas, el primer día del muestreo 1 del segundo periodo, dos novillas presentan una condición de estrés. Con respecto al ITH no se registraron valores por encima de 79, que se reporta como estrés ligero para bovinos, indicando que las condiciones climáticas dentro de los túneles son óptimas bajo estas condiciones específicas.

Tabla 3-4. **Descripción de los índices de bienestar y climáticos dentro de los túneles**

PERIODO	**DÍA**	**Índice Adaptabilidad (IA)**				**Índice de temperatura y humedad (ITH)**			
		CON AEO		**SIN AEO**		**CON AEO**		**SIN AEO**	
		1122	**1126**	**1128**	**1116**	**1122**	**1126**	**1128**	**1116**
1° PERIODO	**Día 1**	2,01	2,27	2,35	2,00	65,56	65,56	67,61	67,61
	Día 2	2,20	2,35	2,20	2,40	71,02	71,02	70,62	70,62
	Día 3	2,60	3,15	2,75	2,47	69,88	69,88	70,85	70,85
		SIN AEO		**CON AEO**		**SIN AEO**		**CON AEO**	
2° PERIODO	**Día 1**	3,01	3,41	2,62	2,35	69,42	69,42	72,08	72,08
	Día 2	2,20	2,87	3,47	2,39	68,18	68,18	70,6	70,6
	Día 3	2,20	2,74	2,00	2,34	60,2	60,2	60,08	60,08

3.3.2. Parámetros de fermentación ruminal, emisión de CH4 y actividad fibrolítica:

La tabla 3-5, describe la respuesta por adición del AEO sobre los parámetros fermentativos, la emisión de CH_4 entérico y actividad fibrolítica a partir de las novillas de raza Holstein.

Tabla 3-5. Parámetros de fermentación ruminal, emisión de CH_4 y actividad fibrolítica evaluados con bajo dos tratamientos: con y sin AEO incluido en la dieta basal de kikuyo en novillas de raza Holstein

Tratamiento	Con AEO	Sin AEO	Valor *p*
N-NH_3 (mg/dl)	5,57	5,39	0,8308
AGVs % (mmoles/100mmoles AGVtotal)			
Acético	40,34	38,04	0,0888
Propiónico	26,90	25,73	0,1914
Butírico	17,30	16,77	0,0898
Isobutírico	17,74	17,14	0,1049
Acético: Propiónico	1,56	1,41	0,1231
CH_4 (L/h)	20,17	19,67	0,7355
CH_4 (L/día)	175,75	192,25	0,7576
Actividad Enzimática (UI)			
Xilanolítca	711,5	1056,5	0,1343
Celulolítica (CMCasa)	21,51	15,13	0,6255

- **Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y pH:**

La concentración de nitrógeno amoniacal (Tabla 3-5), no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (p=0,8308), con una media general de 5,5±0,12 mg/dl con y sin la inclusión de AEO, respectivamente. Para el caso del pH cuantificado se obtuvo en promedio para todos los animales un valor de 7,04 no encontrándose variaciones en este parámetro.

- **Ácidos grasos volátiles (AGVs):**

En términos de AGVs cuantificados no se presentaron diferencias significativas para el propiónico (26,3±0,85 mmoles/100mmoles AGVtotal) y el isobutírico (39,2+1,04 mmoles/100mmoles AGVtotal) , aunque para el ácido acético (p=0,0888) y el butírico (p=0,0898) se encontró una tendencia al incremento de su valor con la inclusión de AEO, sin embargo la relacion acético:propiónico (p=0,1231) no mostró diferencias ni tendencias por la inclusión del AEO (Tabla 3-5),

- **Emisión de CH_4 entérico:**

El CH_4 entérico emitido por la inclusión de AEO, fue cuantificado en valores totales de litros/hora y litros/día, los cuales no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, con un valor de media general de por hora de 19,92±2,49 L/h y por día (p=0,7576) (Tabla 3-5)

- **Evaluación de la actividad fibrolítica**

Para la evaluación de la actividad enzimática fibrolitica, se contemplaron las acividades Endo -1,4-β-glucanasa (celulítica) con una media general de 883,9±199,4 UI y para la **Endo-1,4-β-xilanasa** (xilanolítica) un valor (p=0,1343), como no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (p=0,6255) (Tabla 3-5)

Teniendo en cuenta estos resultados, el nivel de inclusión de AEO trabajado (25 mg/ Kg de MS) no presentó un efecto significativo sobre los parámetros fermentativos evaluados a nivel *in vivo*.

3.3.3. Estructura y diversidad de la comunidad de metanógenos en el rumen

A partir de la extracción de ADN se obtuvo un promedio general de 78,30 (± 28,95) ng/µL de ADN total y un promedio de pureza (260/280) de 2,02 (±0,34). El perfil del ADN total se verificó por electroforesis horizontal de ADN extraído de 12 muestras (Ver Figura 3-4).

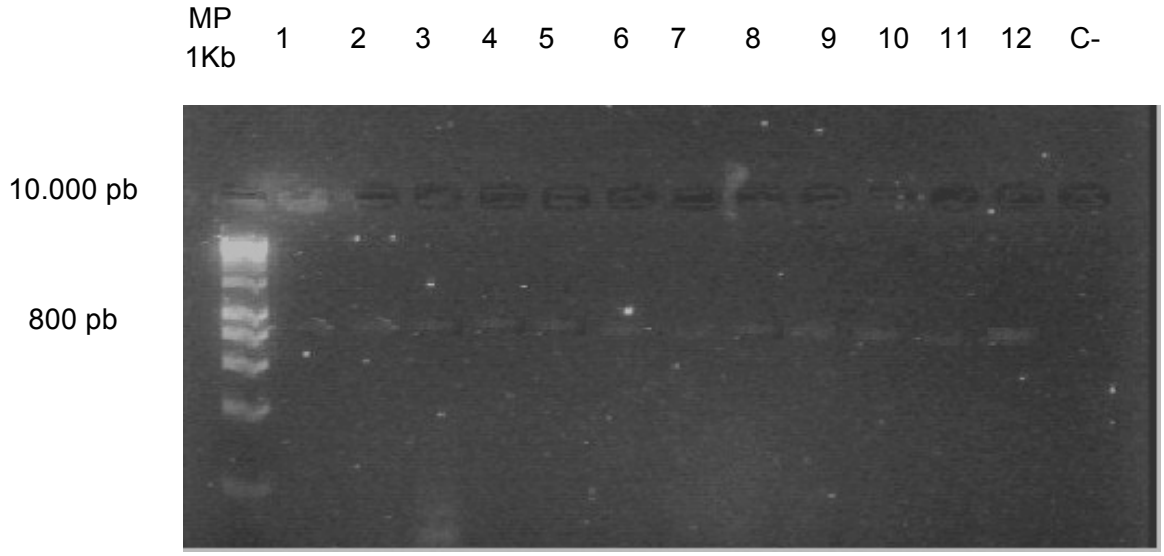


Figura 3-4. Gel de agarosa al 2%, con los productos de la amplificación destinados a pirosecuenciación. Distribución de los carriles de izquierda a derecha: Marcador de peso molecular 1kb, 1: Inicio-1116, 2: Inicio-1126, 3: T1-1122 (con AEO), 4: T1-1128 (sin AEO), 5: T1-1126 (con AEO), 6: T2-1122-TCGA (sin AEO), 7: T2-1128 (con AEO), 8: T1-1116 (sin AEO), 9: Inicio-1122, 10: T2-1116 (Con AEO), 11: T2-1126 (sin AEO), 12: Inicio-1128. Donde Inicio: Muestreo inicial, T1: Primer período, T2: Segundo período. 1116, 1122, 1126 y

1128, corresponde al número de cada uno de las novillas. C-: Control negativo con agua.

La secuención por pirosecuenciación, generó un total de 83441 secuencias, las cuales fueron limpiadas con el programa Bioedit de las cuales se seleccionaron por tamaño aquellas ≥ 80 pb, para un total 54181 secuencias. Este proceso también se realizó para comparación con el RDPipeline, las secuencias tambien fueron sometidas a limpieza manejando valores de calidad para las secuencias (Q: 20) y longitud (120-1000) (Tabla 3-6)

Tabla 3-6. Descripción de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación 454

Tratamiento	No. De animal	N° Secuencias Originales	N° Secuencias >80pb (usando Bioedit)	N° Secuencias >100pb (Secuencias con control de calidad de RDPipeline)
INICIO	1116	2889	2102	983 (46,09)
	1122	8647	6838	4788 (54,94)
	1126	22123	17828	13449 (54,4)
	1128	1972	657	259 (58,15)
CON AEO	1122	4810	881	197 (53,85)
	1126	3963	1057	456 (67,07)
	1128	4563	2701	1805 (56,89)
	1116	14977	9706	6694 (54,51)
SIN AEO	1122	4446	2862	1997 (37,84)
	1126	3064	1638	942 (60,62)
	1128	5328	2780	1934 (66,06)
	1116	6659	5131	3581 (51,05)
TOTAL		83441	54181	37085

Secuencias obtenidas mediante limpieza con el progama BioEdit, y con RDPipeline, usando parámetros de valor de puntaje mínimo (Q): 25, y una longitud de secuencia: minima de 120 y máxima de 1000. N:0 pb: longitud de la secuencia en pares de bases; para cada uno de los animales en los dos tratamientos: ID de los animales: 1116, 1122, 1126 y 1128

3.3.3.1. Clasificación taxonómica y análisis de la diversidad en metanógenos

La asignación taxonómica se realizo con las secuencias provenientes del análisis con Bioedit, seleccionadas para ser procesadas con la herramienta *Classifier* del RDPipeline (Version 2.6) del Ribosomal Database Project (RDP Release 11, Update 1), teniendo en cuenta la identidad de las secuencias obtenida bajo un umbral de confianza del 80%.

Asignación taxonómica realizada con RDP:

Con esta herramienta, la asignación dada a las secuencias para cada uno de los animales en los dos tratamientos fue en su totalidad para el dominio Archaea, dentro del Phylum Euryarchaeota*,* asignado como *Euryarchaeota* Sin Clasificar o RCC (Rumen Cluster C, según Janssen y Kris*,* 2008) en un 90,92%, seguido de la familia *Methanobacteriaceae* 8,03% y una familia de los Thermoplasmatales 1,59%. (Figura 3-5).

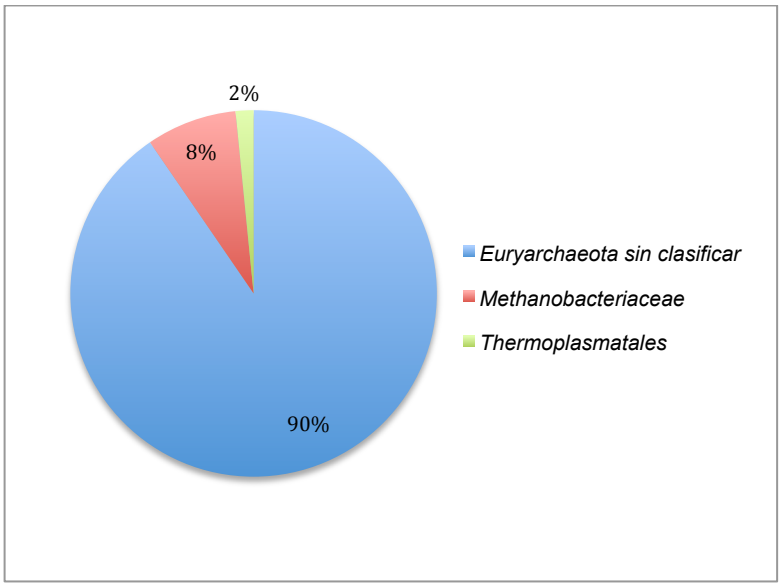
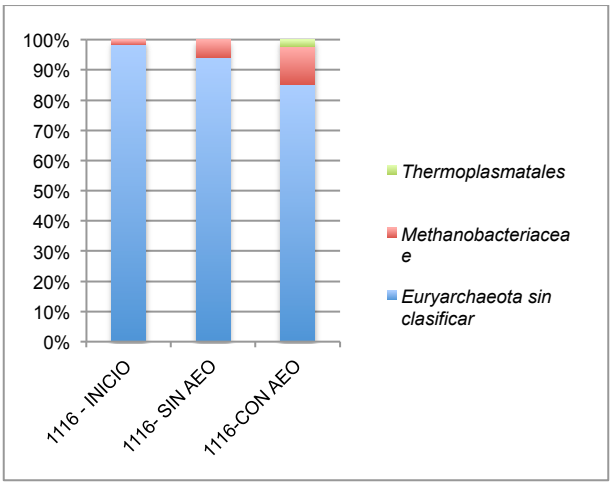


Figura 3-5. Asignación taxonómica total para las 12 secuencias provenientes de las cuatro novillas de raza Holstein en las fases del experimentos, con los dos tratamientos: con y sin AEO

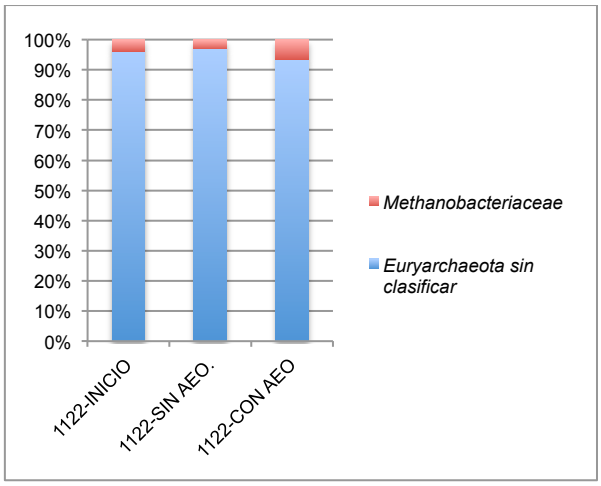
Se realizó el analisis estadistico a partir de las muestras de los cuatro animales, mediante el programa PAST3.x para análisis de datos ecológicos, en los dos periodos con y sin AEO para ver el efecto del tratamiento, el cual en el grupo *Euryarchaeota* Sin Clasificar se vieron diferencias altamente significativas (p:0,00013) y así mismo se vieron diferencias significativas entre animales (p:0001). En cuanto a la familia *Methanobacteriaceae* se presentaron diferencias significativas tanto a nivel de tratamiento (p:0,02162) como de animal (p:0,01), mostrando un efecto del tratamiento sobre las condiciones de las Archaeas metanogenicas; con base en estas diferencias se realizó un análisis individual para los animales.

La asiganción taxonómia para cada uno de los animales, reportó para el caso del animal identificado como 1116 , la asiganción fue de un 98,3% para el grupo *Euryarchaeota* Sin Clasificar, seguido de la familia *Methanobacteriaceae* con un 1,69%; para el tratamiento sin AEO, *Euryarchaeota* Sin Clasificar 94,06% y *Methanobacteriaceae* con un 5,94%, mientras que en el tratamiento con AEO, los porcentajes fueron para el grupo de *Euryarchaeota* Sin Clasificar 85,20%, *Methanobacteriaceae* con un 12,51% y la aparición de un grupo, la familia de los *Thermoplasmatales* con 2,30% (Figura 3-6.a)

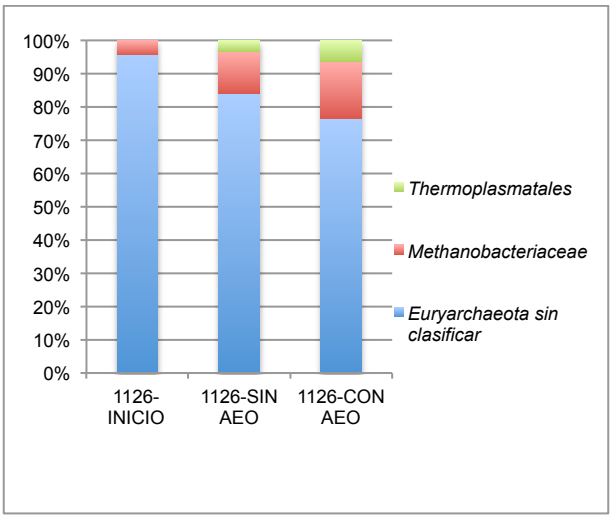
El animal 1122, presentó un 96,17% para las *Euryarchaeota* Sin Clasificar y un 3,83% para las *Methanobacteriaceae* al inicio del experimento, para el tratamiento sin AEO, la asignación fue de un 96,98% para las *Euryarchaeota* Sin Clasificar y un 3,02% para las *Methanobacteriaceae* y con AEO, los procentajes fueron de un 93,58% y un 6,42% respectivamente (Figura 3-6.b). En el animal 1126, para el inicio, sin AEO y con AEO los porcentajes para e grupo *Euryarchaeota* Sin Clasificar fueron de 95,75%, 83,94% y 76,60%, mientras que para la familia *Methanobacteriaceae* los porcentajes fueron de 4,24%, 12,73% y 16,95% respectivamente, para el caso de la familia reportada dentro del orden Thermoplasmatales, se reportó un 3,33% en el tratamiento sin AEO y un 6,43% con AEO (Figura 3-6.c). Por último, para el animal 1128 las asignaciones fueron tambien en un alto porcentaje para el grupo *Euryarchaeota* Sin Clasificar (94,06% inicio, 89,82% sin AEO y 86,49% con AEO), seguido de la familia *Methanobacteriaceae* (5,93% inicio, 10,17% sin AEO y 12,85% con AEO) y por ultimo los *Thermoplasmatales* en 0,64% unicamente en el tratamiento con AEO (Figura 3-6.b)



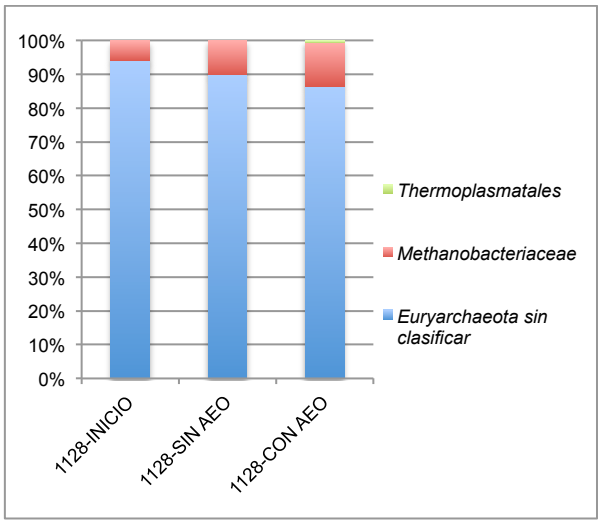
a.



b,



c.



d.

Figura 3-6 Asignaciones taxonómicas dadas a 54181 secuencias en total de 12 muestras provenientes de cada animal, evaluados en tres fases: un período de inicio, y lo dos tratamientos: con y sin AEO, mediante la herramienta classifier del RDPipeline donde: a.análisis para el animal 1116, b. análisis para el animal 1122, c. análisis para el animal 1126 y d. análisis para el animal 1128.

Asignación taxonómica realizada con QIIME:

En el análisis reaizado con el software QIIME Pipeline, este maneja por defecto una 97% de similitud, donde el análisis de asignación taxonómica mediante la herramienta *pick_de_novo_otus.py*, reportó la presencia de organismos del domino *Archaea*, clasificados en mayoría como *Archaeas* Sin asignar (94,43%), y las demás agrupadas en el filum *Crenarchaeota* (0,00046%) y el *Euryarchaeota* (4,24%), con tan solo 2 familias identificadas como *Methanobacteriaceae* (1%), en los géneros *Methanobacterium* (0,01%), *Methanobrevibacter* (0,98%), *Methanosphaera* (0,04%) y un género sin asignar (0,01%), y para el caso de la familia *Methanomassiliicoccaceae* (0,17%), esta última perteneciente a la clase *Thermoplasmata* (Figura 3-7), en resumen de las asignaciones dadas para cada animal 1116 (Figura 3-7.a), 1122 (Figura 3-7.b), 1126 (Figura 3-7.c) y 1128 (Figura 3-7.d)

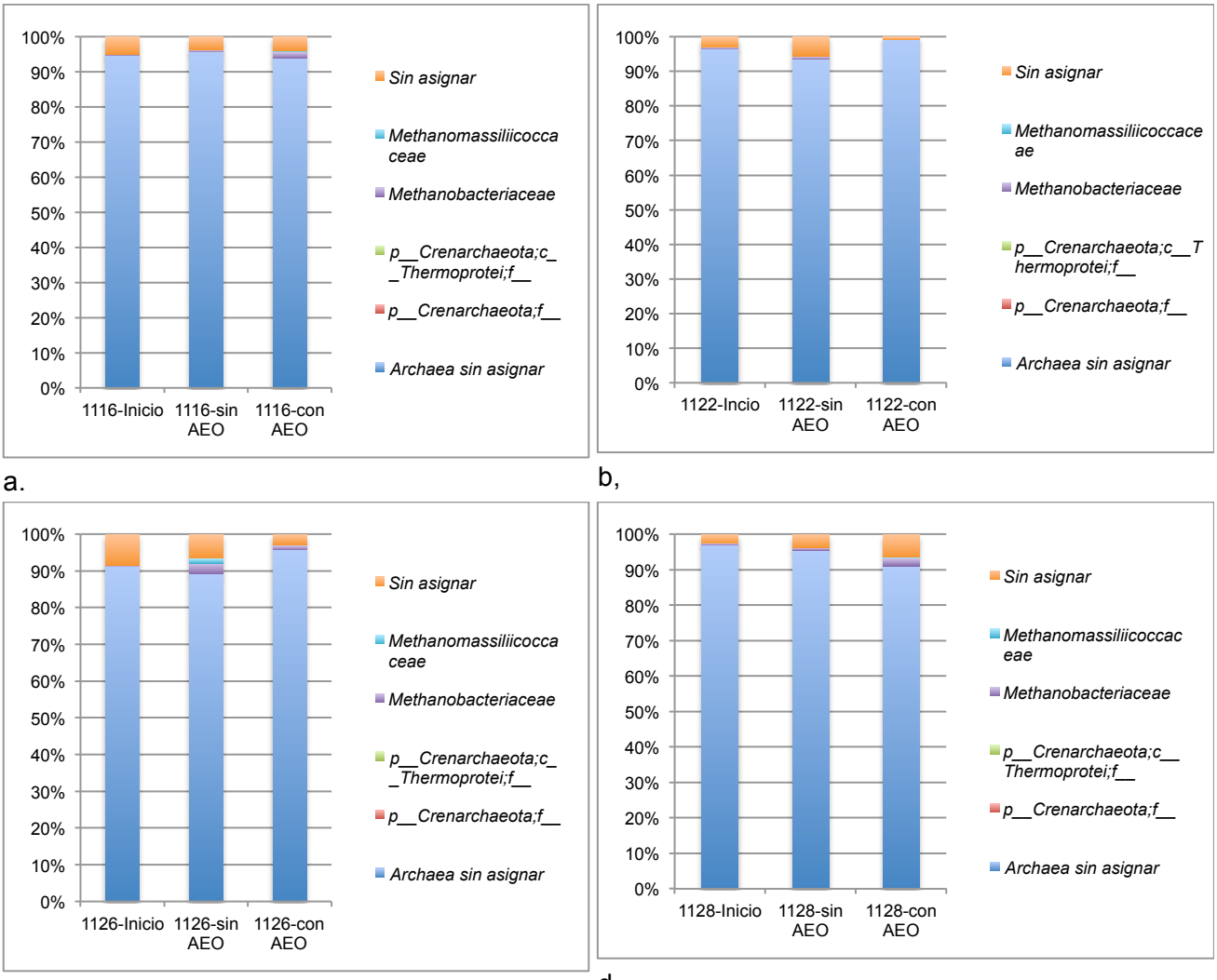


Figura 3-7 Asignaciones taxonómicas dadas a 54181 secuencias en total de 12 muestras provenientes de cada animal, evaluados en dos tratamientos: con y sin AEO, mediante el software QIIME donde: a.análisis para el animal 1116, b. análisis para el animal 1122, c. análisis para el animal 1126 y d. análisis para el animal 1128.

El RCC representa en promedio un 90,91% de la población, y la familia *Methanobacteriaceae*, que en promedio corresponde a un 8,02%, se encuentra la predominancia del género *Methanobrevibacter* que predomina en un 53,13%, frente a otros géneros sin clasificar. En cuanto a la familia *Thermoplasmatales*, están representadas en promedio un 1,05% del total del dominio Archaea identificado.

En lo referente a los análisis independientes de taxonomia, se emplearon los dos programas; con QIIME (Figura 3-8) se realizó la construcción de las curvas de rarefacción, determinando si el número de secuencias obtenidas provee un cobertura eficiente de la secuenciación para el número de OTU's estimados, donde se utilizó el flujo de comandos:

alpha_rarefaction.py, a partir de las curvas generadas se alcanzó el número máximo de OTUs para cada una de las novillas.

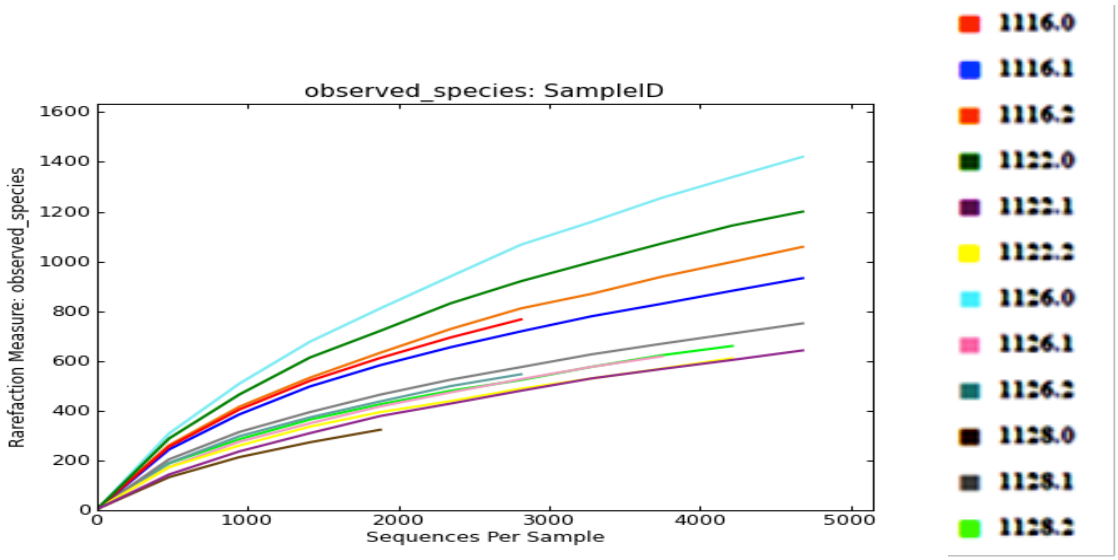


Figura 3-8. Análisis de rarefacción para valoración de la cobertura del número de OTU's para las muestras de contenido ruminal de cuatro novillas raza Holstein tomada en cada periodo: Inicio: 1116.0, 1122.0, 1126.0 y 1128.0;); sin AEO: 1116.1, 1128.1, 1122.2 y 1126.2 y con AEO: 1122.1, 1126.1, 1116.2 y 1128.2.

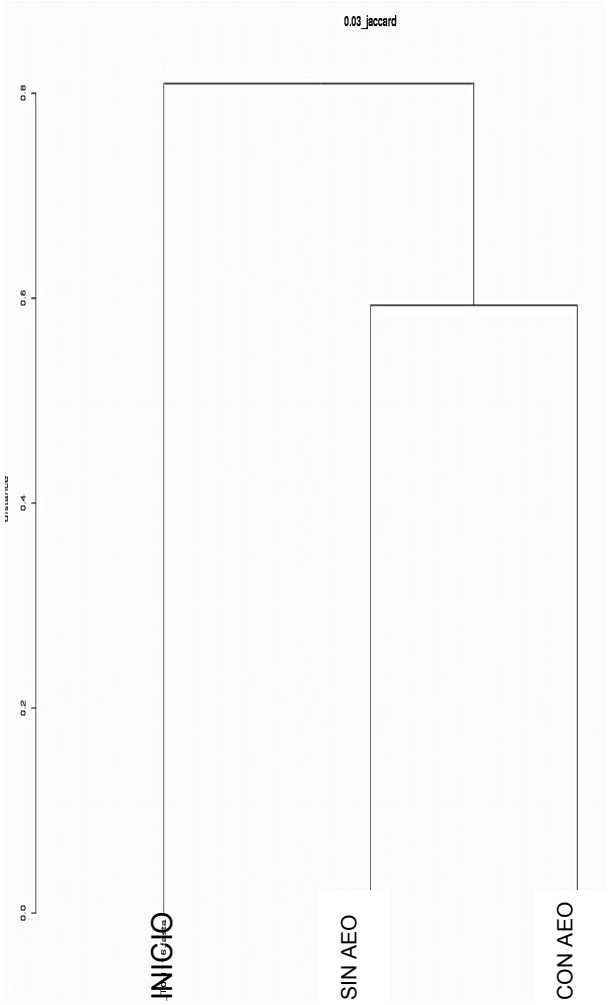
El análisis de diversidad alfa, fue determinado mediante los índices Chao, Shannon-Wiener (H') y Evenness (E) (Tabla 3-7), empleando la aplicación de análisis del RDPipeline a partir de los archivos generados desde la herramienta de alineamiento.

Tabla 3-7. Índices de riqueza, diversidad y abundancia relativa: Chao, Shannon-Wiener y Evenness para cada uno de los animales en los diferentes tratamientos

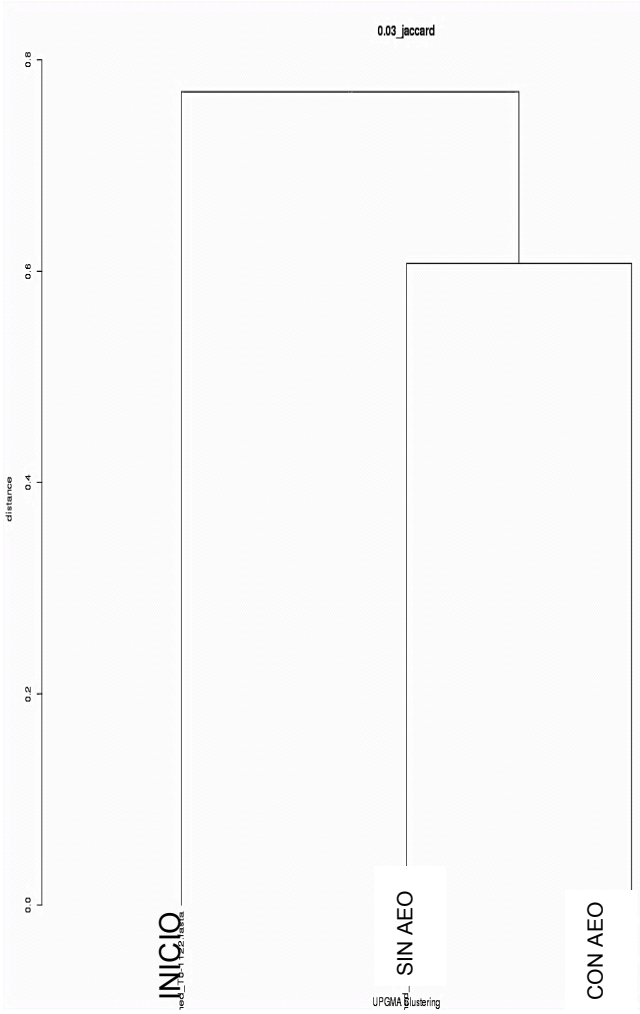
Animal	Índices	Tratamientos		
		Inicio	Sin AEO	Con AEO
1116	OTUs	379	654	1165
	Chao 1	739,75	963,16	2039,41
	Shannon (H')	5,33	5,52	6,05
	Evenness (E)	0,90	0,85	0,86
1122	OTUs	1025	352	74
	Chao 1	1655,43	644,15	109,06
	Shannon (H')	6,01	4,56	3,9
	Evenness (E)	0,87	0,78	0,91
1126	OTUs	2080	241	121
	Chao 1	3222,11	530,13	237,36
	Shannon (H')	6,37	4,83	4,1
	Evenness (E)	0,83	0,88	0,86
1128	OTUs	70	403	353
	Chao 1	136,11	647	663,77
	Shannon (H')	3,64	5,24	4,94
	Evenness (E)	0,86	0,87	0,84

De acuerdo a estos resultados, el indice de Evenness hace los valores de H' comparables entre comunidades mediante el control del número de especies que se encuentran dentro de las estas, E puede variar desde valores cercanos a 0, donde la mayoría de las especies son raras y sólo algunas son abundantes, a 1, donde la uniformidad potencial entre especies (H' max) es igual a la observada (H'). En este caso para todos los animales en todos los tratamientos los valores fueron en promedio 0,86. Respecto a los otros índices, la población microbiana de archaeas analizada tuvo cambios no sólo con la inclusión del AEO, sino con la adaptación a la dieta suministrada durante le estudio y así mismo una respuesta diferente en cada uno de los animales. Para la novilla 1116, la inclusión del AEO presentó un valor de diversidad (H': 6,05) y Chao1 de 2039,41, distinto a lo reflejado en las novillas 1122 y 1126, donde el valor H' (6,01 y 6,37) y el valor Chao1 (1655,43 y 3222,11) fueron superiores en la fase de inicio del experimento, mostrando una disminución al momento en que los animales entraron en la fase experimental de uso de carpa para muestreos de CH_4; así mismo, un cambio de este tipo se ve para el animal 1128, pero este es orientado al aumento en el valor de estos indices respecto al inicio del experimento (H':3,64, Chao1: 136,11).

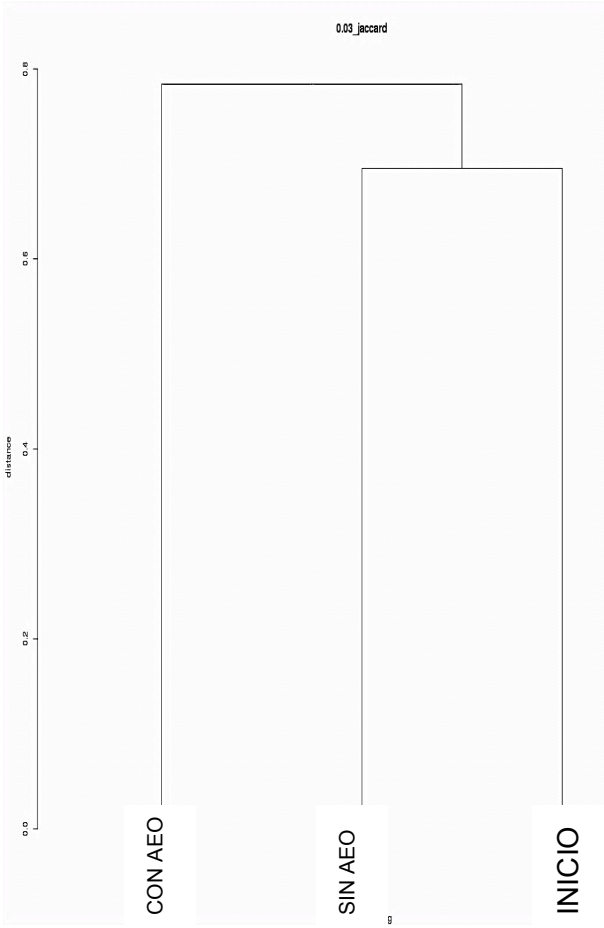
En el análisis de los índices de similaridad, se trabajó el índice de Jaccard (distancia de corte de 0.03) (Figura 3-9) para cada uno de los animales, encontrando agrupamientos de similaridad en los animales 1116, 1122 y 1128 entre los dos tratamientos (sin y con AEO); sin embargo, la novilla 1126 mostró un agrupamiento de similitud diferente a las otros animales, correspondiente al inicio y al tratamiento sin AEO.


0.03_jaccard
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
INICIO
SIN AEO
CON AEO

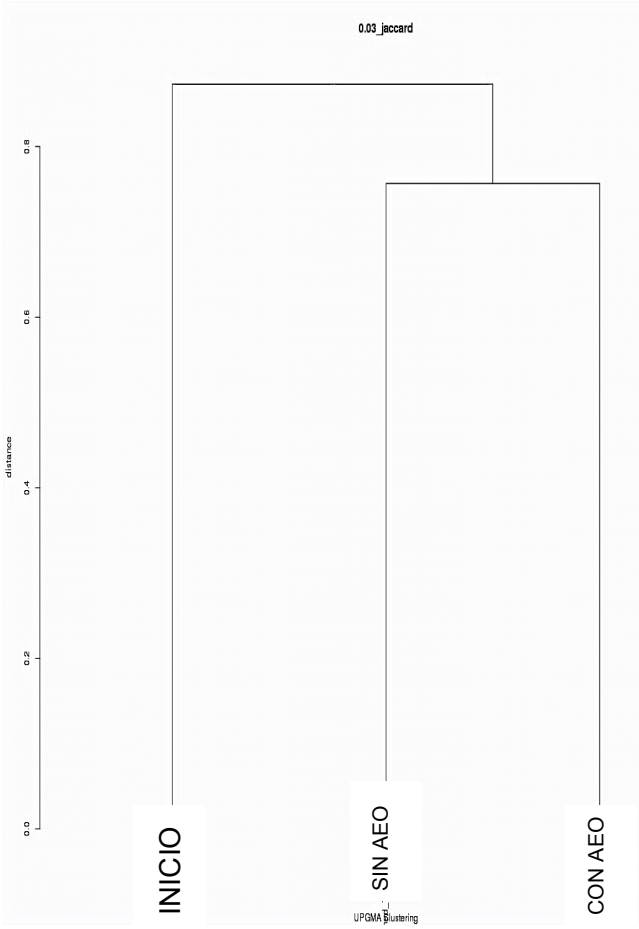
a.


0.03_jaccard
distance
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
INICIO
SIN AEO
CON AEO
UPGMA Clustering

b.



c.



d.

Figura 3-9. Indice de similaridad de Jaccard a una distancia de 0,03 para cada uno de los animales en los dos tratmientos (con y sin AEO), donde: a. Novilla 1116, b. Novilla 1122, c. Novilla 1126 y d. Novilla 1128

De acuerdo a este índice, para la novilla 1116, el agrupamiento se dío entre los tratamientos (con y sin AEO), sin embargo se evidenció una correlación positiva entre el inicio y el tratamiento sin AEO (0.8411); aspecto que se repite en la novilla 1122, cuya correlacion entre el inicio y el tratamiento sin AEO es de 0.9252 y la correlación entre tratamientos fue de 0.6074, y la novilla 1128 presentó una correlación de 0.9446 entre el inicio y sin AEO, sin embargo entre el inicio y el tratamiento con AEO fue de 0.8017. Para el caso de la novilla 1126, en la cual se mostró un agrupamiento diferente al resto, se presentó una correlación entre el inicio y el tratamiento sin AEO de 0.7876, y una correlacion de 0.7804 entre tratamientos.

A partir del QIIME pipeline, se determinó el número de OTU's y los índices de Chao1 y de Shannon realizando un agrupamiento completo de la información por tratamiento, el cual no mostró diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados respecto a la inclusión de AEO como se presenta en la Tabla 3-8

Tabla 3-8. Índices de la diversidad alfa de archaeas provenientes de fluido ruminal de 4 novillas raza holstein bajo una dieta basal de *Penisetum clandestinum* con la inclusión y no inclusión de AEO al inico y en dos períodos experimentales.

Indice	INICIO	SIN AEO	CON AEO	Valor P
OTUs	445,3	416,3	473,0	0,823
Indice de Chao1	1051,2	852,7	984,8	0,9647
Indice de Shannon	7,55	6,89	6,59	0,9488

3.4. Discusión

Los resultados anteriores sugieren que las inclusión del AEO en 25 mg/Kg de MS no generó diferencias en cuanto a la condición corporal de los animales, la fermentación ruminal, la capacidad de degradación medida como actividad fibrolítica, sobre la estructura y diversidad de metanogenos y consecuentemente sobre la emisión de CH_4 entérico.

La respuesta generada por el consumo, depende en primera instancia de la patabilidad que adquieren los diferentes tipos de alimentos cuando se les adicionan los AE, y se relaciona directamente al tipo de AE y a la dosis suministrada, generando una respuesta en el animal. Resultados en terminos de consumo y ganancia de peso, reportan resultados similares en los que emplean AE en la dieta animal, en dosis de 2 g/d de aceite de hinojo en vacas (Yang *et al.* 2007), 250 mg/d de aceite de orégano en ovinos (Wang *et al*. 2009), y 430 mg/k de MS en cabras (Malecky *et al.,* 2009) no mostraron diferencias en el consumo, y en estudios en los que se evaluó la ganancia diaria de peso en ovinos con inclusión en la dieta de hojas de orégano (144 o 280 mg/kg MS) no se observaron diferencias con respecto al tratamiento control (Bampidis *et al.* 2005); tampoco en estudios realizados con bovinos productores de carne, con dosis de 2 o 4 mg/d de una mezcla de aceites esenciales (timol, eugenol, vainillina y limoneno), ni en la media de ganancia diaria de peso con respecto al tratamiento control (Benchaar *et al.* 2006), sin embargo al revisar la literatura sobre los efectos de los aceites esenciales en la fermentación ruminal, la discrepancia entre el gran número de estudios realizados *in vitro* frente a los pocos llevado a cabo *in vivo* es evidente. Si bien este es un enfoque lógico para reducir el costo de la investigación en las fases de exploración de nuevas pruebas de aditivos, pero dadas limitaciones asociadas con los estudios *in vitro*, en términos de

extrapolación de las dosis y las cuestiones de palatabilidad, es imperativo considerarlos para los estudios *in vivo* (DiLorenzo, 2011).

En este estudio la dosis de AEO usada permitió encontrar al timol en una concentración activa a nivel ruminal, sin embargo a pesar de estar presente en el CR analizado, no generó el efecto dentro del ecosistema, llevando a presumir que la dosis es un factor determinante en la respuesta esperada; así diferentes estudios muestran el efecto de la dosis de AE y los CAE sobre la fermentación, como lo reportado por Beauchemin y McGinn en el 2009, quienes mezclaron AE (mezcla comercial de AE y extractos de plantas) en dosis de 1g/d por 21 días en ganado bovino sobre una dieta basal de un 75% de ensilado de cultivos de cebada, un 19% de cebada laminada en vapor, y un 6% de suplemento (base seca), no reveló un efecto en la metanogénesis. De igual manera paso con aceites de *Pinus mugos*, cuyos componentes principales como el limonelle, pipeno, ω3-caren y β-felandreno, en proporciones del 35, 12, 25 y 14% respectivamente, no presentaron actividad antimetanogénica probablemente por su inclusión a muy bajas dosis (8 mg/L) (Patra, 2011). Caso contrario, fue el reportado por Wang *et al.* en el 2009, el cual trabajó una inclusión de 0,25 g/día en la dieta de 4 ovejas por 15 días (La duración experimental consistió en un período de adaptación preliminar de 8 días, seguido por un período de 7 días para medir la ingesta y colecta de las heces) de Ropadiar, un aceite esencial de la planta de orégano, promotor natural del crecimiento antimicrobiano y con propiedades antioxidantes, empleado principalmente en la reducción de efectos de bacterias patógenas y protozoos en el sistema digestivo, estimulando el consumo de alimento en especies no rumiantes (Van Krimpen y Binnendijk, 2001); mostró su eficacia para reducir la emisión de metano el cual generó una producción de metano de 17 g/d, inferior a la producción del control, que fue de 19.4 g/d; otro trabajo a nivel *in vivo*, se desarrollo con ocho vacas de raza Holstein, reportado por Tekippe, *et al.* en el 2011, realizado con un diseño experimental crossover de dos períodos/21 días, incluyó AEO (*Origanum vulgare*) con carvacrol en un 90%, en una concentración de 500 g/d, el cual no tuvo efecto sobre el pH, ni la concentración de AGVs (total e individual), solamente el efecto fue sobre la emisión de CH_4, generando una disminución del 40% (p: 0,004).

De acuerdo a estos resultados y reportes, los AE reflejan respuestas en los animales dependiendo de su composición y la dosis suministrada; encontrando en los aditivos alimenticios y las manipulaciones dietéticas una alternativa de reducción del CH_4 entérico, sin embargo este efecto generalmente ha sido estudiado de manera aislada, pero puede tener efectos sinérgicos o antagónicos dentro del sistema, como se ve reflejado en el análisis de AGVs, donde el nivel de inclusión seleccionado, resultó ser una dosis no significativa para el efecto modulador en la fermentación ruminal en términos de su interacción con las rutas metabólicas, resultado reflejado en la relación acético:propiónico sin diferencias significativas, sugiriendo nuevamente la dosis como un factor determinante en el efecto de los parámetros evaluados, como lo reportado por Khiaosa-ard y Zebeli, en el 2013, ellos usaron AE y CAE en dosis <0.75 g/kg de MS en tres tipos de rumiantes: ganado vacuno, ganado lechero y pequeños rumiantes, los cuales reportaron estos

niveles con potencial inhibidor de CH_4 en el rumen, partiendo de la disminución en la proporción acético:propiónico que reflejo diferencias significativas en esta relación en los pequeños rumiantes (P=0.056), en el ganado vacuno (P=0.005) y lechero (P>0.05); sin embargo Hristov, *et al.* 2013, plantean la poca probabilidad de que las prácticas de reducción en la fermentación entérica puedan llegar a tener efectos sobre la producción del CH_4 entérico, pero así mismo no hay mucha evidencia para respaldar o rechazar esta hipótesis, como también es poco probable que los inhibidores del CH_4 puedan tener un efecto aditivo porque el ecosistema del rumen tiene un límite en cuanto al grado de desequilibrio que puede tolerar antes de afectar negativamente el consumo de alimento, la digestibilidad y la producción animal; de tal manera que con la manipulación de la dieta dirigida se espera el aumento de la digestibilidad de los nutrientes, la disminución en la emisión de CH_4 entérico por unidad de producto, como lo plantea Patra en el 2011, quien hace referencia a que algunos de los constituyentes tienen efectos favorables sobre la fermentación y producción del rumiante, por lo cual se necesita optimizar la dosis, la condición fisiológica de animal y el sistema de alimentación.

En la actualidad son muchos los estudios que se han enfocado en buscar una respuesta asociada al efecto modulador de los AE sobre la fermentación ruminal a nivel *in vitro*, sin embargo es necesario obtener respuestas bajo condiciones *in vivo* en diferentes tipos de rumiantes y bajo diferentes condiciones ambientales y diferentes tipos de dosis, cuyo efecto, también puede estar relacionado con la sensibilidad del animal al AEO teniendo como referente el volumen total del rumen, que puede llegar a influir directamente en el proceso de absorción del AE en la concentración suministrada y que puede llegar a no tomar lugar dentro del metabolismo ruminal (McIntosh, *et al.,* 2003). La hipótesis de emplear el AEO por su efecto modulador sobre las poblaciones metanogénicas, es conducir a la disminución en la emisión y evaluando la respuesta mediante los parámetros fermentativos, que generan la información respecto a lo que esta sucediendo en el sistema; como lo es la actividad enzimática, que muestra la acción degradativa de las demás poblaciones que habitan el rumen sobre el alimento. En este estudio tampoco se vio efecto del AEO en la dosis suministrada sobre las actividades enzimáticas evaluadas y a la fecha, realmente son pocos los reportes que evalúan la actividad enzimática como parámetro de la fermentación a nivel del rumen tras una evaluación de un componente modulador en la producción de CH_4.

Existen reportes que plantean que los AE son particularmente más activos en las superficies vegetales ingeridas, y cuya influencia puede ser mayor sobre los microorganismos asociados a esta fracción que a las especies asociadas al líquido, en donde entra a jugar la acción selectiva del AE, y la variación de especies sobrevivientes a su efecto antimicrobiano, el cual puede ser también ejercido sobre microorganismos microbianos no cultivados (Chen y Wolin, 1979; Newbold *et al.,* 1988) y cuya respuesta será variable en su papel dentro de degradación. Un ejemplo del efecto sobre la actividad degradativa con el uso de extractos de plantas, fue registrado por Patra, en el 2006, quien reporta el efecto de estos compuestos sobre la actividad específica evaluada, mostrando

actividades numéricamente inferiores de CMCasa (191 UI) y xilanasa (1129 UI) a una dosis de 0.50 mL con respecto al control: CMCasa (259 UI) y xilanasa (1529 UI), en la presencia de diferentes extractos vegetales, y esta disminución la asocio a la actividad antiprotozoarios (que poseen alrededor del 38% de la actividad celulasa) de este tipo de componentes, y que se relaciona con la fracción de licor de protozoos del rumen (Agarwal *et al.* 1991). Wallace *et al.* en el 2002, referencian la influencias de los aceites esenciales, sobre algunas poblaciones específicas del rumen, en este ensayo muchas de las especies predominantes de bacterias ruminales se probaron para el crecimiento a diferentes concentraciones de AE en medio de cultivo; sólo *Clostridium sticklandii, Prevotella ruminicola* y *Peptostreptococcus anaerobius* fueron limitados en su crecimiento a 40 ppm de AE, y la metanógena *Methanobrevibacter smithii*, fue igualmente afectada. *Ruminobacter Amylophilus* creció en la presencia de 40 ppm de aceites esenciales, pero los aceites mejoraron enormemente su lisis en la fase estacionaria, resultando ser también sensible. Esta evaluación realizada individualmente, sugiere que algunas bacterias resultan ser susceptibles a la acción de los aceites esenciales, generando una disminución en su actividad específica y en la participación de rutas metabólicas, provocada por la acción de los componentes de los aceites, incluso, no solamente en la actividad fibrolítica, sino otro tipo de mecanismos degradativos.

Aunque algunos AE inhiben a las bacterias generadoras de nitrógeno amoniacal en los experimentos *in vitro*, aún falta evaluar más detalladamente los efectos de estos sobre otros géneros o poblaciones bacterianas, y más puntualmente sobre los microorganismos metanógenos, precisando con esto el antibiograma de los AE (Polin *et al.* 2014) teniendo presente la estructura de estos compuestos fenólicos, tales como el timol, son más eficaces como antimicrobianos en comparación con otros metabolitos secundarios de plantas no fenólicos, debido a la presencia de un grupo hidroxilo en su estructura (Helander *et al*, 1998; Ultee *et al*, 2002); además, el pequeño peso molecular de timol le permite tener acceso a la membrana celular a través de los poros de la pared externa. El amplio y fuerte espectro de actividad antibacteriana (gram-positivas y gram-negativas), da un fuerte y estrecho margen de seguridad entre una óptima dosis tóxica y los efectos reportados, que no siempre están en la dirección deseada (Castillejos *et al.* 2006) y sugieren que su actividad antimicrobiana puede ser demasiado fuerte y no específica para modular la fermentación en un entorno microbiano tan complejo tal como es el rumen, de tal manera que con base en el mayor conocimiento de la ecología y la fermentación ruminal, se debe esperar que las interacciones de la producción del CH_4 entérico sean cada vez más evidentes como resultado de las diferencias en las dietas o las condiciones del animal. En los últimos años, se han realizado esfuerzos de investigación en todo el mundo para clarificar el potencial del animal y la variabilidad genética microbiana con relación a la eficiencia en la utilización del alimento y a la producción de CH_4 entérico (Gerber *et al.* 2013)

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados generados a partir del análisis molecular de secuencias, en donde la asignación taxonómica fue dada en un alto porcentaje al

grupo *Euryarchaeota* Sin Clasificar y *Archaea* sin asignar (94,4%) a partir de un total de 82946 secuencias generadas por la pirosecuenciación y procesadas con las herramientas RDP y QIIME, esta poca variabilidad en términos de asignación se atribuye principalmente a la manera como actualmente se están alimentando las bases de datos con la información que se genera de los diferentes estudios, esta posible respuesta, se relaciona con lo reportado por el Global Rumen Census Project, en el 2014 quienes han encontrado limitaciones en la asignación taxonómica, ya que muchas de las taxas microbianas ruminales son abundantes y frecuentes, pero no se han logrado caracterizar de manera adecuada, debido principalmente por la falta de información de cepas cultivables representativas disponibles, caso muy frecuente en la arqueas metanogénicas ruminales (Henderson et al., 2014), sin embargo el uso de estas herramientas se fundamento en reportes de otros autores como Angarita en el 2013, quien uso de RDP como herramienta de asignación taxonómica, o Kim en el 2011, quien la empleo con la aplicación de secuencias *rrn* de origen ruminal mediante el término de búsqueda "rumen" y "ruminal 'para recoger las secuencias de bacterias y arqueas ruminales, donde las secuencias de " calidad sospechosa" se excluían mediante el uso de la opción de "calidad" en la base de datos de RDP, lo cual permitia una asignación taxonómica específica y más cercana al ecosistema de interés, sin embargo para términos de este estudio, esta herramienta ya no estaba disonible en el RDP, el cual solo da asignaciones para el gen del 16S rRNA, así que se decidió comparar la información generada con otra herramienta de análisis, el software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) referenciado en los reportes de Kittelmann, *et al.*2013 en sus estudios sobre comunidades microbianas del rumen, quien reporta en su estudio el análisis de diferentes cebadores empleados simultáneamente con el fin de evitar un posible sesgo analítico generado al interpretar la información desde el origen de la muestra y hace énfasis en que la elección del primer tiene un mayor impacto aparente en la estructura de la comunidad, lo que puede llegar a producir prejuicios respecto a la detección de grupos de metanógenos, información que está en continuo proceso de construcción, los que podria estar asociado con el resultado de este estudio que genera alto porcentaje de asignación taxonómica de “sin clasificar” o “sin asignar”, teniendo en cuenta que se utilizó el cebador del gen *mrcA* (metil coenzima-M reductasa) (Zhou *et al.* 2010), referenciado por Angarita en el 2013, cuyo trabajo desarrollado bajo condiciones agroclimáticas y experimentales similares a las de este estudió, bajo condiciones de pastoreo de *P. Clandestinum* y *Lotus uliginusus,* reporta la presencia de los géneros *Methanobrevibacter, Methanosphaera, Methanomicrococcus, Methanobacterium, Methanomicrobium* y un grupo sin clasificar denominado en este caso *Euryarchaeota* Sin Clasificar, grupos taxonomicos reportados en este estudio pero en bajo porcentaje respecto al grupo “*sin asignar”*. Janssen y Kris en el 2008, reportaron en su estudio 11 subtipos de Archaea de los géneros *Methanobrevibacter, Methanomicrobium, Methanobacterium, Methanosphaera* y *Methanimicrococcus,* dentro de este análisis la familia *Methanobacteriaceae*, se vió representada principalmente por el género *Methanobrevibacter*; este resultados por lo tanto confirma el predominio y la ubicuidad de las hidrogenotróficas *Methanobrevibacter* en el rumen (Janssen y Kirs,

2008); mientras que se las otras asignaciones taxonómicas fueron para la familia *Methanomassiliicoccaceae,* de la clase Thermoplasmata*,* en un muy bajo porcentaje; esta clase en los reportes de Kim *et al.,* en el 2011, solo estaba representada en las arqueas no cultivables dentro del género *Thermogymnomonas* o *Unclassified_Thermoplasmatales*. Las secuencias de *Thermogymnomonas* fueron asignadas a 31 OTUs a nivel de especie con el contenido de OTUs mas abundante, y 18 secuencias fueron recuperadas de ganado (Wright *et al.,* 2007), de reno (Sundset *et al.,* 2009), ovejas y búfalos (estudios publicados), sin embargo todos los aislamientos de este provienen de campos de arroz o fuentes de aguas profundas hidrotermales (basados en los registros de GenBank), lo que sugiere la necesidad de más estudios para examinar su incidencia en el rumen. Así mismo, Janssen y Kris en el 2008, afirman la gran variedad de diferentes especies metanógenas que el rumen alberga, información proveniente de los análisis de pequeños genes de la subunidad del ARNr de arqueas obtenidos de muestras de rumiantes sometidos a diferentes dietas en todo el mundo, encontrando que la mayoría pertenecen a tres grupos principales: *Methanobrevibacter, Methanomicrobium*, y uno grande, sin embargo, no cultivable, denominado como rumen clúster C (RCC). Una explicación que sugiere la variabilidad de aparición de grupos de archaeas, es la expuesta por Henderson *et al.* en el 2013, quienes encontraron que la elección del método de extracción de ADN afecta significativamente la representación de algunos grupos de arqueas, especialmente las '*Methanoplasmatales*', también conocidas como el grupo Rumen Cluster C grupo. El uso del bead beater tiende a producir menos '*Methanoplasmatales*', mientras que los métodos menos físicos proporcionan una tendencia a más. Esto puede ser debido a que estos organismos se lisan con mayor facilidad, pero esto aún no se ha demostrado. Caso contrario se observó para las secuencias que del grupo Methanosphaera, que al parecer requieren una mayor alteración para liberar su ADN, lo que explica su presencia en mayor porcentaje en este análisis, generando un efecto sobre la población, de tal manera, que el método de extracción puede ser una variable adicional a la inclusión de AEO al momento de evaluar las poblaciones metanogenicas.

En términos de los análisis independientes de taxonomia, la curva de rarefacción mostró que si la curva de alguna de las categorías no se extiende hasta el final del eje de las x, representa que al menos una de las muestras de esta categoría no tiene esa cantidad de muestras, como es evidente para las muestras tomadas al inicio del experimento, mientras que la eficiencia de la secuenciación para las especies observadas (OTUs) de los dos periodos evaluados con y sin AEO, fue similar, reportando un cambio en la riqueza de especies presentes en las muestras, y así mismo un posible cambio debido al acostumbramiento de la dieta o al estrés generado por la introducción de los animales en la carpa, condición que tambien se mostró con los indices de Chao1, Shannon y E, evaluados, donde la inclusión del AEO en la dieta basal no generó un efecto sobre la población, y que los cambios presentados podrían estar asociados principalmente es a la condición experimental a la que fueron sometidos los animales, como la dieta y el permanecer en confinamiento en los túneles, ya que al mirar los indices por tratamiento

(con y sin AEO) y de manera particular, por animal, la adición del aceite no representó un cambio en los indices, información que se mostró también en los agrupamientos derivados por el análisis de Jaccard, donde solo uno de los animales, la novilla 1126, que mostró un agrupamiento distinto, posiblemente atribuido a la inclusión de AEO, sin embargo, aunque este índice presentó este tipo de agrupamientos, las correlaciones resultaron altas y positivas entre el inicio y el tratamiento sin AEO, respecto al tratamiento con AEO, lo que lleva a presumir un posible cambio en las poblaciones de archaeas de las 4 novillas tras la inclusión de AEO sobre la diversidad, sin embargo esto no se vio reflejado en la emisión de CH_4, esta información se puede asociar con el hecho de que miembros de grupos taxonómicos con una baja representación dentro de un ecosistema complejo pueden llegar a codificar estrategias a nivel bioquímico o jugar un papel importante en la regulación de roles fisiológicos y ecológicos de toda la comunidad (Podar *et al.* 2007), y que aunque en este estudio no hayan tenido una asignación taxonómica, la cantidad de individuos presentes en las muestras, información reflejado a través de indices de diversidad y riqueza evaluados en cada novilla durante el experimento, implica que los cambios en las poblaciones no dominantes podrían relacionarse con los cambios en aquellas dominantes y viceversa; sin embargo las relaciones de co-ocurrencia entre metanógenos no es aún del todo clara (Kittelmann *et al.* 2013). También hay que tener presente las características del hospedador, el cual puede llegar a producir "filtros ambientales" propios de hospedador a hospedador, generalmente asociados a la localización geográfica, el genotipo (Guan *et al.* 2008) y la dieta (Mohammed *et al.* 2011; Pitta *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012). Estos parámetros son comúnmente evaluados como responsables de los cambios en las comunidades, pero aún bajo condiciones homogéneas (tal como se procuraron mantener para este trabajo), se ha demostrado que el ambiente interno del hospedador direcciona la colonización y persistencia de taxas específicas, generando interacciones positivas con condiciones facilitadoras y negativas por competencia, así el orden de la colonización determina la estructura de la comunidad (Robinson *et al.* 2010),

De acuerdo a los resultados obtenidos, es probable que el monitoreo de la cantidad total de metanógenos no sea el único factor en la identificación de estrategias de mitigación (Zhou *et al.* 2010), debido a que las interacciones entre las comunidades microbianas del rumen son complejas y han evolucionado durante miles de años, y debido a esta alta complejidad no es viable formular planes exitosos y concluyentes de mitigación del CH_4 entérico sin entender estas interacciones, la alimentación cruzada entre especies, la competencia por el sustrato y la cinética del H_2. Un ejemplo clásico de la interacción de las especies en la formación de CH_4 es aquella de los protozoarios y metanógenos, aunque las investigaciones han encontrado pocas relaciones entre la metanogénesis y la densidad de protozoarios. La degradación de los carbohidratos está directamente relacionada con la producción de CH_4, pero las interacciones en la digestión de los carbohidratos incluyen la fuente (estructurales vs. no estructurales), el pH ruminal, la composición de la proteína de los alimentos y la disponibilidad de N en el rumen, y el

grado de escape del rumen, además del sitio de digestión de los carbohidratos. Estas dos últimas categorías también tienen efectos en la utilización del N y en las emisiones potenciales de N_2O del suelo. (Gerber *et al.* 2013)

4. Conclusiones y recomendaciones

4.3. Conclusiones

El AEO de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía a diferentes niveles de inclusión bajo condiciones *in vitro* empleando Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) como sustrato, en los niveles de inclusión de 10 a 75 mg AEO /mL no generó un efecto negativo sobre la producción de gas y la DIVMS, mientras que el nivel más alto de 100 mgAEO/mL, provocó efectos adversos en los parámetros fermentativos evaluados y los niveles de 25 y 50 mg AEO /mL una reducción de la tasa máxima de producción de CH_4 en 40 y 43% respectivamente.

La adicion de AEO a nivel de 25 mg/Kg de MS a novillas Holstein bajo una dieta basal de kikuyo no afecto significativamente la diversidad de las poblaciones de arqueas metanogénicas ruminales medidas con los índices de diversidad Chao y Shannon.

La asignación taxonómica en mas del 90% no fue dada a categorías taxonómicas conocidas a la fecha y fueron variables de acuerdo a la novilla y tratamiento, así mismo el uso de bases de datos diferentes para el análisis (RDP y Qiime), generó asignaciones taxonómicas entre un 90,91% según RDP y 94,43%, según Qiime; y siendo el género dominate Methanobrevibacter con 53,13% según análisis con RDP y 0,98% según análisis con Qiime.

La adición del 25 25 mg/Kg a nivel *in vivo* AEO no generó un efecto al no mostrar diferencias significativas en los parámetros fermentativos evaluados.

El nivel de emisión de metano no siempre se correlaciona con la dinámica de metanógenos presentes, lo que sugiere estudios sobre la estructura completa de la comunidad y sus interacciones como factores claves en la identificación de estrategias de mitigación como los AEO.

3.4.4.4. Recomendaciones

El AEO Lippia origanoides Kunth, como aceite nativo y primera vez empleado en rumiantes, resulta necesario evaluarlo en otras dosis de inclusión, adecuadas para los procesos fermentativos del rumiante y una acción mitigadora en la emisión de metano, teniendo en cuenta que esta

Implementar el uso de otros genes objetivo como los genes mrcI (metil coenzima M reductasa I) y mrcII (metil coenzima M reductasa II isoenzima) que se relacionan con niveles de H2 disponible y están presentes en Methanobrevibacter, el género dominante en la población, para así evitar problemas en la asignación taxonómica al momento de usar diferentes bases de datos.

Emplear bases de datos continuamente curadas, y así mismo, enriquecer esta información a nivel de poblaciones de Archaeas, cada vez que se obtienen resultados de estudios sobre estos microorganismos.

Es preciso tener en cuenta el método de extracción de ADN, el cual puede generar una influencia en la obtención y análisis de secuencias para la interpretación de datos de diversidad poblacional de archaeas, puesto que algunas poblaciones son susceptibles al método de lisis celular.

Evaluar las demás poblaciones microbianas del ecosistema ruminal, empleando técnicas de secuenciación de nueva generación para análisis metagenómico, lo cual permitiría la exploración de la co-ocurrencia de patrones entre bacterias, hongos, protozoarios y arqueas, y generar un perfil de dinámica poblacional cuando son sometidos a este tipo de estudios bajo tratamientos específicos en animales individuales, y así mismo orientar estos estudios a otros análisis de interacción y metabolitos que interfieren dentro del procesos a traves de otras ómicas que provean de esta información completa del sistema, y así mismo sea integral con un sistema productivo y con el enfoque ambiental que debe tener.

4.5. Bibliografía

Abdalla, A. L., Louvandini, H., Sallam, S. M. A. H., Bueno, I. C. D. S., Tsai, S. M., & Figueira, A. V. D. O. (2012). In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. *Tropical animal health and production*, *44*(5), 953–64. doi:10.1007/s11250-011-9992-0

Ackie, R. I. M., Minov, R. I. A., & Hite, B. A. W. (2000). Molecular Ecology and Diversity in Gut Microbial Ecosystems. *Molecular Ecology*, 61–78.

Agarwal, N., Kewalramani, N., Kamra, D.N., Agarwal, D.K., Nath, K., 1991. Hydrolytic enzymes of buffalo rumen: comparison of cell free rumen fluid, bacterial and protozoal fractions. Buff. J. 7, 203–207.

Akin, D.E., N. Ames-Gottfred, R.D. Harley, R.G. Fulcher, and L.L. Rigsby. 1990. Microspectrophotmetry of phenolic compounds in Bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. Crop Sci. 30:396–401.

Aklilu W. Alemu, J. Dijkstra, A. Bannink, J. France, E. Kebreab. 2011. Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. Animal Feed Science and Technology, Volumes 166–167. Pages 761–778

Anderson, Robin C.,, Callaway, T., Ann,J., Van Kessel,S., Jung,Yong S., Edrington, Thomas S., Nisbet David J. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. Bioresource Technology; 90(1):59-63. DOI:10.1016/S0960-8524(03)00086-

Angarita A.E., Gonzalez C.E., Martín E., Barahona R. Tesis de pregrado: Efecto de la inclusión de aceite de coco sobre la producción de metano y parámetros de fermentación ruminal en novillas utilizando la técnica del túnel. Universidad de Cundinamarca. 2007.

Angarita, Erika. Efecto de la inclusión de un forraje tanífero sobre las poblaciones metanogénicas del ecosistema ruminal en condiciones in vitro e in vivo. 2013. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad nacional de Colombia. Bogotá.

Ashby K. D., Casey, T. A. Rasmussen, M. A. and Petrich, J. W. 2001. Steady-state and time-resolved spectroscopy of F420 extracted from methanogen cells and its utility as a marker for fecal contamination. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 49, no. 3, pp. 1123–1127.

Asplund, J. M. 1994. The influence of energy on amino acid supply and utilization in the ruminant. In: Principles of Protein Nutrition of Ruminants. Asplund, J. M. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA

Attwood, G., & McSweeney, C. (2008). Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H 2 utilisation in the rumen. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *48*(2), 28. doi:10.1071/EA07203

Attwood, G. T., Altermann, E., Kelly, W. J., Leahy, S. C., Zhang, L., & Morrison, M. (2011). Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 65–75. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.004

Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., Van Vuuren, A.M., Tamminga, S., 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating dairy cows. J. Theor. Biol. 238, 36–51.

Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., Van Vuuren, A.M., Tamminga, S., 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. J. Theor. Biol. 238, 36–51

Baker, S.K., 1999. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. Aust. J. Agric. Res. 50, 1293–1298.

Barr. D.J.S.,1988. How modern systematics relates to the rumen fungi. BioSystems 21, 351-356.

Barr.D.J.S., Kudi, H., Jakober, K.D., Cheng, K. 1989. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix sp.*, *Piromyces comunis* and *Orpinomyces bovis* gen.nov., sp.nov. Can.J.Bot. 67, 2815-2824

Barr, D.J.S., Yanke, L.J., Bae H.D., McAllister T.A., Cheng K.J. 1995. Contribution omn the morphology and taxonomy of some rumen fundi from Canada. Mycotaxon 54, 203-214

Barry, T. N., & Duncan, S. J. (1984). The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. 1. Voluntary intake. *The British journal of nutrition*, *51*(3), 485–91. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3676235

Bampidis VA, Christodoulou V, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB, Chatzopoulou PS. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. Anim Feed Sci Tech 2005;(121):285-295.

Beauchemin, K. A. and S. M. Mcginn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. J. Anim. Sci. 83:653.

Beauchemin KA, McGinn SM, McAllister TA. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. CAB Rev. Perspect Agric VetSci Nutr Nat Resour; 4:1-18.

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan · L. Y Hoondal, G. S., (2001): Microbial Xilanases and their industrial applications: a review , Appl Microbiol Biotechnol, 56:326–338.

Beijer W.H. 1952. Methane fermentation in the rumen of cattle. Nature 170: 576-577.

Bekele, A. Z., Koike, S., & Kobayashi, Y. (2010). Genetic diversity and diet specificity of ruminal Prevotella revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS microbiology letters*, *305*(1), 49–57. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01911.x

Benchaar C, Duynisveld JL, Charmley E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion, and growth performance of beef cattle. Can J Anim Sci 2006;(86):91-96.

Benchaar and Chiquette., (inédito). En: Benchaar, C. and Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology. 166: 338-355

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.

Benchaar, C., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Wang, Y., Beauchemin, K. A. And McAllister, T. A. 2007. Effects of Essential Oils and Their Components on in Vitro Rumen Microbial Fermentation. Can. J. Anim. Sci., 87: 413–419.

Benchaar, C., Chaves, A., Fraser, G., Beauchemin, K., McAllister, T., 2007. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. Can. J. Anim. Sci. 87, 413–419.

Benchaar, C., Greathead, H., 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 166–167, 338–355.

Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J., Chouinard, P.Y., 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. J. Dairy Sci. 90, 886–897.

Benchaar, C., Hassanat, F., Gervais, R., Chouinard, P.Y., Petit, H.V., Massé D.I., 2014. Methane production, digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and milk production of cows fed corn silage- or barley silage-based diets. Journal of Dairy Science. February 2014(Vol. 97, Issue 2,Pages 961-974)

Benezra, M.V. (1954) A new index for measuring the adaptability of cattle to tropical conditions. Joumal of Animal Science, 13, 1015.

Bergman, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. Physiological Reviews, v.70, p.567-590, 1990.

Bergman, E.N., 1990. Energy contribution of VFA from the gastrointestinal tract in various species. Physiol. Rev. 70, 567–590

Beuvink, J. M. W., Spoelstra, S. F., Hogendorp, R. J. 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Neth. J. Agric. Sci. 40 401–407.

Beuvink J M and Kogut J 1993 Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. Journal of Animal Science. 71: 1041-1046.

BHAT M.K. and HAZLEWOOD, G.P.,: Enzymology and Other Characteristics of Cellulases and Xilanases, Enzymes in farm animal nutrition, CABI publishing, 2001, cap. 2, London, U.K, pp 10-60.

Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, a, Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of dairy science*, *92*(11), 5512–22. doi:10.3168/jds.2008-1441

Blair, N.E. and Aller, R.C. (1995) Anaerobic methane oxidation on the Amazon shelf. Geoochimica et Cosmochimica Acta 59, 3707–3715.

Blümmel, M., Orskov, E. R.. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle, Anim. Feed Sci. Technol. 40: 109-119.

Blümmel, M., Orskov, E. R.. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle, *Anim. Feed Sci. Technol.* 40: 109-119.

Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., & Massé, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*, *84*(3), 319–335. doi:10.4141/A03-109

Bonilla Cárdenas, J.A.; Lemus Flores, C. 2012. Enteric methane emission by ruminants and its contribution to global climate change. Review. // Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. Rev Mex Cienc Pecu 2012 ;3(2):215-246

BONILLA, J.A. y LEMUS, Cl. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático: Revisión. Rev. mex. de cienc. pecuarias [online]. vol.3, n.2 [citado 2014-06-02], pp. 215-246 . Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-1124.

Brauman, A., D.M. Kane., M. Labat, and J.A. Breznak. 1992. Genesis of acetate and Methane by gut bacteria of nutritionally diverse termite. Science. 257: 1384-1387

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998;56:317–33.

Breznak John A., Jodi M. Switzer, and H.-J. Seitz. 1988. Sporomusa termitida sp. Nov., an H2/CO2-utilizing acetogen isolate from termites. Arch. Microbiol. 150: 282-288

Breznak John A., Matthew D. Kane. 1990. Microbial H2/CO2 acetogenesis in animal guts; nature and nutritional significance. FEMS Microbiology Reviews. 87:309-314

Brookman, J. L., Mennim, G., Trinci, a P., Theodorou, M. K., & Tuckwell, D. S. (2000). Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 185 rRNA. *Microbiology (Reading, England)*, *146 (Pt 2*, 393–403. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708378

Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller MEB (2009) Genecentric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. P Natl Acad Sci USA 106: 1948–1953.

Bryant, M. P., Robinson, I. M. 1968. Effects of diet, time after feeding and position sampled on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. *J. dairy Sci.* 51: 1950-1955.

Bryant, M.P., 1953. Nutritional requeriments of the predominant rumen cellulolityc bacteria. Fed Proc. 32: 1809-1813

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microb. 94, 223–253

Buriánková I, Brablcová L, Mach V, Hýblová A, Badurová P et al. (2012) Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. Fundam Appl Limnol 17: 87-102. doi: 10.1127/1863-9135/2012/0283

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int. J. Food. Microbiol. 94:223-253.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 89:761–771.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, (2011) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods 7: 335–336.

Cardenas, E., Cole, J. R., Tiedje, J. M., & Park, J.-H. (2009). Microbial Community Analysis using RDP II (Ribosomal Database Project II):Methods, Tools and New Advances. *Environmental Engineering Research*, *14*(1), 3–9. doi:10.4491/eer.2009.14.1.003

Cardenas, Morales, M., León, J., & Vargas, J. (2011). *Lotus: Nueva Leguminosa para los sistemas lecheros de clima frío y zonas templadas*.

Carmona CJ, Bolívar MD, Giraldo AL. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. Rev Col Cienc Pecu;18:1(49-63).

Carmona, J.; Bolívar, D.; Giraldo L. 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): 49-63.

Carmona, J.; Bolívar, D.; Giraldo L. 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): 49-63.

Calsamiglia, S., L. Castillejos, and M. Busquet. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. Pages 129-167 in Recent Advances in Animal Nutrition. P.C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Essential oils for modifying rumen fermentation: A review. J. Dairy Sci. 90:2580-2595.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. J. Dairy Sci. 89, 2649–2658.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martìn-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. Technol. 145, 259–270.

Castro, E., Carulla, J., & Cárdenas, E. (2009). Productive potential of Lotus uliginosus in specialized dairy systems at the high altitudes of Colombian Andes, 2009.

Chamberlain, A.T. 1994. The gas production capacity of purifified chemicals and feedstuffs when incubated in vitro with rumen microbies as a posible indicator of energy availability in the rumen. In: British Society of Animal Production. Jubilee Winter Meeting. Paper Nº 91.

Chaves, A. V., K. Stanford, L. L. Gibson, T. A. McAllister, and C. Benchaar. 2008. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 145:396–408.

Chen, M., and M. J. Wolin. 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 38:72–77.

Cheng, K. J., McAllister, T. A. 1997. Compartimentation in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem.* Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Eds.). Blackie Academic and professional. London, UK.
Church, D.C., (1993): El rumiante fisiologìa digastiva y nutriciòn. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

Chiquette, J., Cheng, K.-J., Rode, L. M., & Milligan, L. P. (1989). Effect Of Tannin Content In Two Isosynthetic Strains Of Birdsfoot Trb , Foil (Lotus Corniculutus L .) On Feed Digestibility And Rumen Fluid Composition In Sheep little or no reduction in. *Canadian Journal of Animal Science*, *1039*(69), 1031–1039.

Clark, H., & Kelliher, F. (2011). Reducing CH 4 Emissions from Grazing Ruminants in New Zealand : Challenges and Opportunities *, *24*(2), 295–302.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, a S. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, *37*(Database issue), D141–5. doi:10.1093/nar/gkn879

Colombatto D. y Beauchemin K.A. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. Can. J. Anim. Sci. 83: 559-568.

Cone J W, Van Gelder A H and Driehuis F 1997 Description of gas production profiles with a three-phasic model. Animal Feed Science and Technology. 66: 31-45

Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Visscher, G.J.W., Oudshoorn, L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. Anim. Feed Sci. Technol. 61, 113-128España.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12:564–582.

Cunningham, J. G. 1994. *Fisiología Veterinaria.* Interamericana. Mc Graw-Hill.

Czerkawski, J.W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford,UK

Dahllöf, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(3), 213–217. doi:10.1016/S0958-1669(02)00314-2

Davies, D. R., Theodorou, M. K., Lawrence, M. I. G., Trinci, A. P. J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *J. Gen. Microbiol*. 139: 1395–1400

De Rosa, M., Gambacorta, A., 1988. The lipids of archaebacteria. Prog. Lipid Res. 27, 153–175.

Demeyer DI 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In Rumen microbial metabolism and ruminant digestion (ed. JP Jouany), pp. 217–237. INRA Editions, Versailles, France.

Deng W, Xi D, Mao H &WanapatM(2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. Mol Biol Rep 35: 265–274.

Denman S.E y McSweeney C. S. 2005. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20:283–294.

DeLong, E. F., & Pace, N. R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic biology*, *50*(4), 470–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116647

Dehority, B. A. (1986): Rumen ciliate fauna of some Brazilian cattle: occurrence of several ciliates new to the rumen, including the cycloposthid Parentodinium africanum. Journal of Protozoology 33: 416-421.

Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS microbiology ecology*, *58*(3), 572–82. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x

Denman, S. E., Tomkins, N. W., & McSweeney, C. S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS microbiology ecology*, *62*(3), 313–22. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00394.x

Deppenmeier, U. 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 71:223

Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. J. Agric. Food Chem. 54, 2745–2749.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. J. Agric. Food Chem. 55, 4863–4870.

DiLorenzo, N.2011. Manipulation of the Rumen Microbial Environment to Improve Performance of Beef Cattl . Fuente: http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2011/11diLorenzo.pdf. Fecha de Consulta: Enero de 2014.

Dore, J.B. Morvan., F. Rieu-Lesme., Y. Goderel., P. Gouet., P. Pochart. 1995. Most probable number enumeration or H2-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. FEMS Microbiology Letters. 130: 7-12

Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88:308–316.

Earl JG, Hall R, Pickup W, Ritchie DA, Edwards C (2003) Analysis of Methanogen Diversity in a Hypereutrophic Lake Using PCR-RFLP Analysis of mcr Sequences. FEMS Microbiol Ecol 46: 270-278. doi:10.1007/s00248-003-2003-x

Edwards JE, McEwan NR, Travis AJ & Wallace RJ (2004) 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. Anton Leeuw Int J G 86: 263–281.

Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A. and Mount, J.R. (2001) Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J Food Prot 64, 1019–1024.

Ellis, J.L., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., Dijkstra, J., 2010. Evaluation of enteric methane prediction equations for dairy cows used in whole farm models. Glob. Change Biol. 16, 3246–3256.

Eloff A.K. and van Hoven, 1980, Intestinal protozoa of the African elephant Loxodonta africana (Blumenbach), S. Afr. J. Zool. 15 (1980), pp. 83–90.

Escalante, A. E. (1986). Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. *La ecología molecular de los microorganimos* (pp. 393–424).

Euge` ne M, Archime` de H and Sauvant D 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. Livestock Production Science 85, 81–97

Evans, J.D., Martin, S.A., 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. Curr. Microbiol. 41, 336–340.

Ferry, J.G.1997. Methane: Small molecule Big Impact. Science. 278:1413-1414

Fondevilla, M. y Dehority, B.A. 1996. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in co-culture or added sequentially. J. Appl. Bacteriol. 77: 541-548

Fonty, G. y Joblin, N. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen micro organisms in relation to fiber digestion. En: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Proceeding of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology (eds Tsuda T.; Sasaki, Y. y Kawashima, R.) Capitulo 26, p 655-680.

France, J., Dijkstra, J., 2005. Volatile fatty acid production. In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Eds.), Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. CAB International, Wallingford, UK, pp. 157–174.

France, J., Lopez, S., Kebreab, E., & Bannink, A. (2005). A general compartmental model for interpreting gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, *124*, 473–485. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.038

France, J., Theodorou, M. K., Lowman, R. S., & Beever, D. E. (2000). Feed Evaluation for Animal Production, 1–10.

Fraser, G.R., Chaves, A.V.,Wang, Y., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., Benchaar, C., 2007. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. J. Dairy Sci. 90, 2315–2328.

Frey, J.C., Pell, A.N., Berthiaume, R., Lapierre, H., Lee, S., Ha, J.K., Mendell, J.E., Angert, E.R., 2009. Comparative studiesof microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. J. Appl. Microbiol. 108, 1982–1993.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Forestier, N., Gillet, F., Aragno, M., (2007). Minireview Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, *4*(2002), 634–643.

Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, A. R. (2004). Review . Tannins and ruminant nutrition Tannins : structure and chemical, *2*, 191–202.

Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, a. R. (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*, *95*(3-4), 215–226. doi:10.1016/S0377-8401(01)00323-6

Fuente: (www.genomesonline.org). Consultado en Marzo de 2013.

Fuente: http://qiime.sourceforge.net/. Consultado en Enero de 2014.

Gerber, P. J., A. N. Hristov, B. Henderson, H. Makkar, J. Oh, C. Lee, R. Meinen, F. Montes, T. Ott, J. Firkins, A. Rotz, C. Dell, A. T. Adesogan, W. Z. Yang, J. M. Tricarico, E. Kebreab, G. Waghorn, J. Dijkstra and S. Oosting. 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. Animal, 7:s2, 220–234.

Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (1998) In Vitro Gas Measuring Techniques For Assessment Of Nutritional Quality Of Feeds: A Review. Animal Feed Science And Technology, 72, 261-281.

Giannenas, I., J. Skoufos, C. Giannkopoulos, M. Wiemann, O. Gortzi., S. Lalas, and I. Kyriazakis. 2011. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. J. Dairy Sci. 94:5569–5577.

Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, Gilna P, Joint I. 2008. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. PLoS One, 3(8):e3042.

Goel, G, Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2008a). Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of applied microbiology*, *105*(3), 770–7. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03818.x

Goel, G, Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2008b). Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of applied microbiology*, *105*(3), 770–7. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03818.x

Goel, Gunjan, & Makkar, H. P. S. (2012a). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, *44*(4), 729–39. doi:10.1007/s11250-011-9966-2

Goel, Gunjan, & Makkar, H. P. S. (2012b). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, *44*(4), 729–39. doi:10.1007/s11250-011-9966-2

Goel, Gunjan, Puniya, a K., Aguilar, C. N., & Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Die Naturwissenschaften*, *92*(11), 497–503. doi:10.1007/s00114-005-0040-7

Goering, H. K. y Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis. Agr. Handbook No. 379, Agricultural Research Service, USDA, Washington, D.C. 20 p.

Gordon, G. L. R., Phillips, M. W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminant. *Nutr. Res. Rev.* 11: 135-168.

Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A., Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 64, 77–89

Grainger, C., & Beauchemin, K. a. (2011). Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 308–320. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.021

Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proc. Nutr. Soc. 62: 79–290.

Guan, L. L., Nkrumah, J. D., Basarab, J. a, & Moore, S. S. (2008). Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS microbiology letters*, *288*(1), 85–91. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01343.x

Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen microorganisms. Lett. Appl. Microbiol. 47, 421–426.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biologicalsequence alignment editor and analysis programfor Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser 41:95-98.

Hallam SJ, Girguis PR, Preston CM, Richardson PM, DeLong EF (2003) Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A (mcrA) Genes Associated with Methane-Oxidizing. Archaea - Appl Environ Microbiol 69: 5483-5491. doi:10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003.

Hart, K.J., Ya˜nez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 147,8–35.

Hegarty RS 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. Australian Journal of Agricultural Research 50, 1321–1327

Hobson, P. N and Stewart,C. S., 1997. The Rumen Microbial Ecosystem, Chapman and Hall, London, UK,

Hobson, P. N., Wallace, R. J. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. *Crit. Rev. Microbiol*. 9: 253-320

Hoffmann, R. R. 1988. Anatomy of the gastrointestinal tract. In: *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition* Church, D. C. (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall. NJ.

Hook, S.E., Northwood, K.S., Wright, A.D., McBride, B.W., 2009. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. Appl. Environ. Microbiol. 75, 374–380.

Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci*. 69:2755–2766.

Hungate, R. E. 1966 *The rumen and its microbes*. Academic Press, London and New York.

H.P.S: Makkar, C. S. M. (2005). *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. *Atomic Energy*.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST : PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS, *4*(1), 1–9.

Handelsman, J. (2004). Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Society*, *68*(4), 669–685. doi:10.1128/MBR.68.4.669

Hansen, L.B., Finster, K., Fossing, H. and Iversen, N. (1998) Anaerobic methane oxidation in sulfate depleted sediments: effects of sulfate and molybdate addition. Aquatic Microbial Ecology 14, 195–204.

Harder, J. (1997) Anaerobic methane oxidation by bacteria employing 14C-methane uncontaminated with 14C-carbon monoxide. Marine Geology 137, 13–23.

Hariadi, B. T., & Santoso, B. (2010). Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid, (December 2009), 456–461. doi:10.1002/jsfa.3839

Helander, I. M., H. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm,I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, and A. Wright. 1998. Characteritzation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46:3590–3595.

Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, (2013) Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. PLoS ONE 8(9): e74787. doi:10.1371/journal.pone.0074787

Henderson, G., Cox, F., Cookson,A., Attwood, G., Leahy, S., Kelly, W., Janssen, P., 2014. Abstract Who's there? A global census of rumen microbial diversity to ISME15 Symposium in Seoul in August (http://www.isme-microbes.org/isme15)

Hess, H.D., Kreuzer, M., Díaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R., & Machmüller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, *109*(1-4), 79–94. doi:10.1016/S0377-8401(03)00212-8

Hess, H.D., Tiemann, T. T., Noto, F., Carulla, J. E., & Kreuzer, M. (2006). Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *International Congress Series*, *1293*, 164–167. doi:10.1016/j.ics.2006.01.010

Hillman, K., A. G. Williams, and D. Lloyd. 1995. Postprandial variations in endogenous metabolic activities of ovine rumen ciliate protozoa. Anim. Feed Sci. Technol. 52: 237-247.

Hristov, A.N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J. & Oosting, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera – Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO2. Editado por Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson y Harinder P.S. Makkar. Producción y Sanidad Animal FAO Documento No. 177. FAO, Roma, Italia.

Hook, S E, Northwood, K. S., Wright, a-D. G., & McBride, B. W. (2009). Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Applied and environmental microbiology*, *75*(2), 374–80. doi:10.1128/AEM.01672-08

Hook, Sarah E, Wright, A.-D. G., & McBride, B. W. (2010). Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, *2010*, 945785. doi:10.1155/2010/945785

Hobson PN & Stewart CS (1997) The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, New York.

Hungate, R. E., Fletcher, D. W. Dougherty, R. W. Barrentine, B. F. 1955. Microbial activity in the bovine rumen: Its measurement and relation to bloat. *Applied Microbiol*.3: 161.

Hungate, R.E., 1970. A Rolle Tube methed for Cultivation of Strict Anaerobes. In Norris J.R. and Ribbon D.W. (eds) Methods in Microbiology. 3B., Academic Press, pp. II 7-I 32. London, New York.

Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannan, B. J. M. (2001). Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity MINIREVIEW Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. doi:10.1128/AEM.67.10.4399

Jami, E., & Mizrahi, I. (2012). Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. (López-García, Ed.)*PLoS ONE*, *7*(3), e33306.

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*(1-2), 1–22. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.07.002

Janssen, P. H., & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, *74*(12), 3619–25. doi:10.1128/AEM.02812-07

Jarvis, G. N., Stro, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R. B., & Joblin, K. N. (2000). Isolation and Identification of Ruminal Methanogens from Grazing Cattle. *International Journal*, *40*, 327–332. doi:10.1007/s002849910065

Jayanegara, A., Leiber, F., & Kreuzer, M. (2012). Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, *96*(3), 365–75. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x

Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2009). Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an in vitro rumen fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, *150*(3-4), 230–237. doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.10.011

Joblin, K., 2005. Methods in gut microbial ecology for ruminants. In: Makkar, H.P.S., McSweeney, C.S. (Eds.), Methanogenic Archaea. Springer, Netherlands, pp. 47–53.

Jones, W.J., Nagle Jr., D.P., Whitman, W.B., 1987. Methanogens and the diversity of archaebacteria. Microbiol. Rev. 51, 135–177.

Jouany, J. P., 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*. 126:1335-1346.

Jouany, J.-P., Morgavi, D.P., 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Animal 1, 1443–1466.

Jouany, J., Thivend, P. 1986. In vitro effect of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. Animal Feed Sci. and Technol. 15:215-229.

Johnson, K. a, & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of animal science*, *73*(8), 2483–92. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567486

Jones, G. A., Mcallister, T. A., Muir, A. D., & Cheng, K. (1994). Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminal Bacteria Effects of Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop .) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminal Bacteriat, *60*(4).

Joyce, Andrew R., Palsson, Bernhard O. 2006. The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. Nature Reviews Molecular Cell Biology 7, 198-210 doi:10.1038/nrm1857IS - 3

Kajikawa, H., C. Valdes, K. Hillman, R. J. Wallace and C. J. Newbold. 2003. Methane oxidation and its coupled electronsink reactions in ruminal fluid. Lett. Appl. Microbiol. 36:354-

Kamalak, Adem; Canbolat, Önder; Özkan, Çağrı Özgür; Atalay, Ali İhsan. 2011. Effect of Thymol on In Vitro Gas Production, Digestibility and Metabolizable Energy Content of Alfalfa Hay. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi; Vol. 17 Issue 5, p211

Kamra, D N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current*, *89*(1).

Kamra, D. N., Patra, a. K., Chatterjee, P. N., Kumar, R., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C. (2008). Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *48*(2), 175. doi:10.1071/EA07268

Kang, S., Denman, S.E., Morrison, M., Yu, Z., McSweeney, C.S., 2009. An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. Curr. Microbiol. 58, 464–471

Kaps, M., & Lamberson, W. (2004). *Biostatistics for animal science*. (M. Kaps & W. Lamberson, Eds.). Wallingford: Cabi. doi:10.1079/9780851998206.0000

Khiaosa-ard R, Zebeli Q. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants.J Anim Sci. (4):1819-30. doi: 10.2527/jas.2012-5691.

Kim, J., Marshall, M. R. and Wei, C.-I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil compounds against five foodborne pathogens. J. Agri. Food Chem. 43: 2839–2845.

Kim, M., Morrison, M., Zhongtang, Y. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes FEMS Microbiol Ecol. 2011 April; 76(1): 49–63.. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x

Kintzios, E. Orégano. The genera Origanum and Lippia. Taylor & Francis. 2002. 267 p.

Kittelmann, S., Seedorf, H., Walters, W. a, Clemente, J. C., Knight, R., Gordon, J. I., & Janssen, P. H. (2013). Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PloS one*, *8*(2), e47879. doi:10.1371/journal.pone.0047879

Kletzin, A., 2007. General characteristics and important model organisms. En: Cavicchioli, R. (Ed.), Archaea: Molecular and Cellular Biology. ASM Press, Washinton, DC, USA, pp. 14–92.

Klein L., Wright A., 2006. Construction and operation of open-circuit methane chambers for small ruminants. Aust J Exp Agric; 46:1257-1262

Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M. Rode, L. M. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen cycling in the rumen, *J. Anim. Sci.* 78:2431–2445.

Koike, S., & Kobayashi, Y. (2009). Fibrolytic Rumen Bacteria : Their Ecology and Functions *, *22*(1), 131–138.

Kraus, T. E. C., Yu, Z., Preston, C. M., Dahlgren, R. a, & Zasoski, R. J. (2003). Linking chemical reactivity and protein precipitation to structural characteristics of foliar tannins. *Journal of chemical ecology*, *29*(3), 703–30. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757329

Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T. & Mcsweeney, C. S. (2003) Opportunities To Improve Fibre Degradation In The Rumen: Microbiology, Ecology, And Genomics. Fems Microbiology Reviews, 27, 663-693.

Krishnamoorthy, U., Rymer, C., & Robinson, P. H. (2005). The in vitro gas production technique: Limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124*, 1–7. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.015

Kumar, S., Puniya, A. K., Puniya, M., Dagar, S. S., Sirohi, S. K., Singh, K., & Griffith, G. W. (2009). Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(9), 1557–1566. doi:10.1007/s11274-009-0041-3

Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R. a, & McCrabb, G. J. (1999). Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *The British journal of nutrition*, *81*(3), 227–34. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10434849

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91, 453–462.

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR & Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. Environ Microbiol 7: 530–543.

Leahy, S. C., Kelly, W. J., Altermann, E., Ronimus, R. S., Yeoman, C. J., Pacheco, D. M., Li, D.,(2010). The genome sequence of the rumen methanogen Methanobrevibacter ruminantium reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PloS one*, *5*(1), e8926. doi:10.1371/journal.pone.0008926

Lee, K.G., Shibamoto, T., 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [Syzgium aromaticum (L.) Merr. et Perry]. Food Chem. 74, 443–448.

Leonowicz A, Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas M.W., Cho N., Hofrichter, M., Y Rogalsk,I. J., (1999), Review: Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi., Fungal Genetics and Biology 27: 175-185.

Li, J. y Heath, I. B. & Packer, L. 1993. The phylogenetic relationships of the anaerobic Chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the Chytridiomycota. II. Cladistic analysis of structural data and description of Neocallimasticales ord. nov. Canadian Journal of botany 71: 393-407.Barr, D.J.S. 1988. How modern systematic relates to the rumen fungi. ByoSystems 21: 351-356

Li, J. y Heath, I. B. 1992. The phylogenetic relationships of the anaerobic Chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the Chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. Canadian Journal of botany 70: 1738-1746.

Li, M., Penner, G. B., Hernandez-Sanabria, E., Oba, M., & Guan, L. L. (2009). Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *Journal of applied microbiology*, *107*(6), 1924–34. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04376.x

Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1125*, 171–89. doi:10.1196/annals.1419.019

López, S., France, J., Dijkstra, J., & Dhanoa, M. S. (2000). Models to Interpret Degradation Profiles Obtained from In Vitro and In Situ Incubation of Ruminant Feeds. *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals* (pp. 73–86).

López, S., Valdés, C., Newbold, C.J. & Wallace, R.J. 1999. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro. Br. J. Nutr. 81:59

Lopez, S. , and C. J. Newbold. 2007. "Measuring methane emission of ruminants by in vitro and in vivo techniques." Pp. 1-13 in Measuring Methane Production from Ruminants, edited by Harinder P.S.; Vercoe Makkar, Philip E. (Eds.). Vienna, Austria: Springer

Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW (2002) The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. Microbiology 148: 3521-3530. PubMed: 12427943.

Macheboeuf, D., Morgavi, D.P., Papon, Y., Mousset, J.L., Arturo-Schaan, M., 2008. Dose–response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 335–350.

Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am. J. Clin. Nutr. 69:1035S–1045S.

Mackie, R. I., R. I. Aminov, B. A. White, and C. S. McSweeney. 2000. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems, p. 61–77. In P. B. Cronje, E. A. Boomker, P. H. Henning, W. Schultheiss, and J. G. van der Valt (ed.), Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom.

Mackie, R.I., White, B.A. & Bryant, M.P. 1992. Methanogenesis, Biochemestry. En : Encyclopedia of Microbiology. Lederberg, J. Ed. Academia Press, San Diego, p. 97

Machmüller, A., Oliva, C. R. S., & Reuzer, M. K. (2003). Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.*, *43*, 41–55. doi:10.1051/rnd

Makkar, H P S. (2002). *Development and field evaluation of animal feed supplementation packages* (pp. 23–43).

Makkar, H.P.S. (2003). *Quantification of Tannins in Tree Foliage Quantification of Tannins in Tree Foliage*.

Makkar, Harinder P.S., Singh, B., & Dawra, R. K. (1988). Effect of tannin-rich leaves of oak. *British Journal of Nutrition*, *60*, 287–296.

Makkar H.P.S. 2001. Recent advances in in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Animal production and Health section, Joint FAO/IAEA division. Vienna – Austria

Malecky M, Broudiscou LP, Schmidely P. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. Anim Feed Sci Tech 2009;(154):24-35.

Marino, M., C. Bersani, and G. Comi. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. Int. J. Food Microbiol. 67:187–195.

Martin, C., Doreau, M., & Morgavi, D. P. (2008). Methane mitigation in ruminants : from rumen microbes to the animal. *British Journal of Nutrition*.

Martin, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal : an international journal of animal bioscience*, *4*(3), 351–65. doi:10.1017/S1751731109990620

Martín E, Perez E, Cañón S, Rodríguez J y Rodríguez F. 2005. Sonda oro-ruminal experimental como alternativa para la obtención de microorganismos anaeróbicos del rumen. Revista Corpoica Vol. 1 N°1 pp 39-42.

Martínez, M.E. 2009.. Estudios de simulación del ecosistema ruminal en sistemas in vitro: aspectos metodológicos. Tesis Dr.Sc. Universidad de León. León.

Martínez, S., Madrid, J., Hernández, F., Megías, M.D., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J., 2006. Effect of thyme essential oils (Thymus hyemalis and Thymus zygis) and monensin on in vitro ruminal degradation and volatile fatty acid production. J. Agric. Food Chem. 54, 6598–6602.

Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S., & Theodorou, M. K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation, *79*, 321–330.

Mayorga, O. L. 2003. Estudio y caracterización del complejo de enzimas degradadoras de la pared celular producidas por el hongo anaeróbico ruminal Neocallimastix frontalis. Tesis M.Sc. en Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Mayorga, O. L. (2009). *Microbial colonisation and subsequent biofilm formation by rumen bacteria on ingested fresh perennial ryegrass*. *Doctor*.

McAllister, T. a, Bae, H. D., Jones, G. a, & Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*, *72*(11), 3004–18. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730196

McBee, R. H. 1953. Manometric method for the valuation of microbial activity of rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. Appl. Microbiol. 1:106.

McCaughey W, Wittenberg K, Corrigan D. 1997.,Methane production by steers on pasture. Can J An Sc,; 76 (3): 519-524

McCaughey W, Wittenberg K, Corrigan D. 1999. Impact of pasture type on methane production by lacting beef cows. Can J An Sc,; 79 (2): 221-226.

McCaughey W, Wittenberg K, Corrigan D. 2000., Impact of pasture type on methane production by lacting beef cows. Can J An Sc,; 79 (2): 221-226.

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), 3346–56. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542482

McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 69:5011–5014.

McMahon, L. R., McAllister, T. a., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D., Coulman, B. E. (2000). A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, *80*(3), 469–485. doi:10.4141/P99-050

Mcsweeney, C., Kang, S., Gagen, E., Davis, C., Morrison, M., & Denman, S. (2009). Revista Brasileira de Zootecnia Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation Recent

developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. *Revista Brasileira De Zootecnia*, *3598*.

McSweeney, C., & Mackie, R. (2012). Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. *Commission on genetic resources for food and agricultural*.

Mcsweeney, C. S., Denman, S. E., Wright, A. G., & Yu, Z. (2007). Application of Recent DNA / RNA-based Techniques in Rumen Ecology *. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *20*(2), 283–294.

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J. Agric. Sci. Camb. 93: 217-222

Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.

Merry, R. J., McAllan, A. B. Smith, R. H. 1990. *In vitro* continuous culture studies on the effect of nitrogen source on rumen microbial growth and fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 31: 55-64

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, *11*(1), 31–46. doi:10.1038/nrg2626

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., (2008). The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, *9*, 386. doi:10.1186/1471-2105-9-386

Miller, T.L., Wolin, M.J., Zhao, H.X., Bryant, M.P., 1986. Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 51, 201–202

Min, B. R., & Hart, S. P. (2003). Tannins for suppression of internal parasites The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Tannins for suppression of internal parasites.

Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., Fulford, J. D., & Puchala, R. (2006a). Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of animal science*, *84*(9), 2546–54. doi:10.2527/jas.2005-590

Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., Fulford, J. D., & Puchala, R. (2006b). Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of animal science*, *84*(9), 2546–54. doi:10.2527/jas.2005-590

Min, B. R., Pinchak, W. E., Anderson, R. C., & Hume, M. E. (2006). In vitro bacterial growth and in vivo ruminal microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. *Journal of animal science*, *84*(10), 2873–82. doi:10.2527/jas.2005-399

Min, B. R., Pinchak, W. E., Fulford, J. D., & Puchala, R. (2005). Wheat pasture bloat dynamics , in vitro ruminal gas production , and potential bloat mitigation with condensed tannins The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Wheat pasture b, 1322–1331.

Mitchell, D. a., Von Meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *17*(1), 15–26. doi:10.1016/S1369-703X(03)00120-7

Miura, K., Kikuzaki, H. & Nakatani, N., 2002. Antioxidant activity of chemical components from sage (Salvia officinalis L.) and thyme (Thymus vulgaris L.) measured by the oil stability index method. J. Agric. Food Chem. 50, 1845-51.

Mohammed, R., Zhou, M., Koenig, K. M., Beauchemin, K. a., & Guan, L. L. (2011). Evaluation of rumen methanogen diversity in cattle fed diets containing dry corn distillers grains and condensed tannins using PCR-DGGE and qRT-PCR analyses. *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 122–131. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.061

Montenegro J, Abarca S. 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE – FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 334 p

Monge-Najera, Juliã¡N. Moreno, C. 2001. Métodos para medir la biodiversidad: Vol. 1. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Oficina Regional de Ciencia y TecnologÃ-a para América Latina y el Caribe de UNESCO y Sociedad Entomológica Aragonesa. Serie Manuales y Tesis SEA. 84 p. Rev. biol. trop [online]. 2001, vol.49, n.3-4 [cited 2014-06-03], pp. 1300-1302 . Available from: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442001000300090&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0034-774

Moreira, G. D., Lima, P. D. M. T., Borges, B. O., Primavesi, O., Longo, C., McManus, C., Abdalla, A. (2012). Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. *Tropical animal health and production*, 6–9. doi:10.1007/s11250-012-0284-0

Morgavi, D.P., Jouany, J.P., Martin, C. & Ranilla, M.J. 2005. Archael community structure in the rumen of faunated and defaunated sheep. 2nd International Conference on Greenhouse gases and Animal Agriculture. Soliva, C.R., Takahashi, J. & Kreuzer, M. Eds. Publication Series, Institute of animal Science, ETH Zurich, Switzerland.

Morgavi, D. P., Jouany J.P 2006. "Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep." International Congress Series 1293: 127-130.

Morgavi, D. P., Jouany, J. P., Martin, C. & Ranilla, M. J. (2006) Archaeal Community Structure Diversity In The Rumen Of Faunated And Defaunated Sheep. *International Congress Series,* 1293, 127-130.

Morgavi, D. P., Eugène, M., Martin, C., & Doreau, M. (2011). Reducing methane emissions in ruminants : is it an achievable goal ?, (99), 65–73.

Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants, 1024–1036.

Morvan Brieuc, Fréderique Bonnemoy, Gérard Fonty, and Phulippe Gouet. 1996. Quantitative determination of H2-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and Methanogenic archae from digestive tract of diferen Mammals. Current Microbiology. 32:129-133

Moss AR, Givens DI. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. Animal Feed Science and Technology; 97: 127- 143

Moss AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences. Ann Zootech; 49: 231-253

Moss, A.R. 2002. Environmental control of methane production by ruminants. En: Greenhouse gases and animal agriculture. Takahashi, J. & Young, B.A. Eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. p 67

Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., & Morgavi, D. P. (2011). Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of animal science*, *89*(3), 783–91. doi:10.2527/jas.2010-2947

Mould , F.L. and Ørskov, E.R. 1983/84. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. Animal Feed Science and Technology 10:1-14.

Murase, J. and Kimura, M. (1994) Methane production and its fate in paddy fields. IV. Source of microorganisms and substrates responsible for anaerobic methane oxidation in subsoil. Soil Science and Plant Nutrition 40, 57–61.

Murray, P. J., Gill, E., Baldson, S. L., Jarvis, S. C. 2001. A comparison of methane emissions from sheep grazing pastures with differing management intensities. Nutrient Cycling in Agroecosystems 60. 93-97.

Murray, P.J., Chadwi, D.C., Newbold, C.J y Lockyer D.R. 2004. Measurement of methane from grazing animals- the tunnel method. Institute of Grassland and Environmental research, Devon UK.

National Research Council (NRC) (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised edition. National Academy Press.

Nakayama, J. 2010. Pyrosequence-Based 16S rRNA Profiling of Gastro-Intestinal Microbiota. Bioscience and Microflora, 29(2):83-96.

Nelson, K. E., Thonney, M. L., Woolston, T. K., Zinder, S. H., & Pell, A. N. (1998). Phenotypic and Phylogenetic Characterization of Ruminal Tannin-Tolerant Bacteria Phenotypic and Phylogenetic Characterization of Ruminal Tannin-Tolerant Bacteria.

Newbold, C. J., R. J. Wallace, N. D. Watt, and A. J. Richardson. 1988. The effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 54:544–547.

Newbold, J., & Kim, E. J. (2009). Reducing animal greenhouse gas emissions.

Noguera R R, Saliba E O y Mauricio R M.,2004. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. Livestock Research for Rural Development. Volume 16, Art. #86. Retrieved December 3, 2004, from http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/nogu16086.html

Noguera, R. R. (2007). Comparación de modelos matemáticos : una aplicación en la evaluación de alimentos para animales, 141–148.

Nuñez, M. 2011. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (Oreochromis niloticus) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. Tesis de maestria. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

Oh, H. K., T. Sakai, M. B. Jones, and W. M. Longhurst. 1967. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. Appl. Microbiol. 68:777–784.

Ohene-Adjei, S., Chaves, a V, McAllister, T. a, Benchaar, C., Teather, R. M., & Forster, R. J. (2008). Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microbial ecology*, *56*(2), 234–42. doi:10.1007/s00248-007-9340-0

Okine, E. K., Basarab, J. A., Goonewardene, L. A., & Mir, P. (2004). Residual Feed Intake and Feed Efficiency : Differences and Implications, *7666*, 27–38.

Olesen, J.E., Bindi, M., 2002. Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. J. Agron. 16, 239–262.

Olsen, G. J., Woese, C. R., & Overbeek, R. (1994). MINIREVIEW The Winds of (Evolutionary) Change : Breathing New Life into Microbiology, *176*(1), 1–6.

Oppermann, R.A., Nelson, W.O., Brown, R.E., 1957. In vitro studies on methanogenic rumen bacteria. J. Dairy Sci. 40, 770–788

Orpin, C. G. 1984 The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Sci. Technol.* 10, 121-143.

Orpin, C. G., Joblin, K. N. 1987. The rumen anaerobic fungi. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.). Chapman and Hall, London, UK.

Ørskov, E. R., Ryle, M. 1990. *Energy nutrition in ruminants.* Elsevier Applied Sci., Londres and NY.

Ozkose, E.; Thomas, B. J.; Davies, D. R.; Griffth, G. W. y Theodorou, M. K. 2001. Cyllamyces aberensis gen. nov. sp. Nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. Can. J. Bot. 79: 666-673

Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A & Itabashi H (2005) The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. Biosci Biotech Bioch 69: 499–506.

Panganiban, A.T. Jr, Patt, T.E., Hart, W. and Hanson, R.S. (1979) Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples.Applied and Environmental Microbiology 37, 303–309.

Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Marsilio, F., Suzzi, G., 2008. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against Listeria monocytogenes. Food Control 19, 1174–1182.

Parra, Diana y Ávila, Mauricio. 2010. Determinación De Los Parámetros Fisiologicos Y Dinamica Ruminal De Bovinos En Condiciones De Politunel Para Evaluar Emisiones De Metano En Trópico Alto Y Bajo Colombiano. Tesis de pregrado. Facultad de Zootecnia. Universidad de Cundinamarca.

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.Anim.Feed.Sci.Technol.128,276–291.

Patra, A. K., & Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, *96*(4), 363–75. doi:10.1007/s10482-009-9364-1

Patra, A. K., & Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the science of food and agriculture*, *91*(1), 24–37. doi:10.1002/jsfa.4152

Patra AK. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial 494 ecology and ruminant production. Asian J. Anim. Vet. Adv. 6: 416-428.

Patra AK1, Yu Z. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. Appl Environ Microbiol;78(12):4271-80. doi: 10.1128/AEM.00309-12.

Paynter, M.J., Hungate, R.E., 1968. Characterization of Methanobacterium mobilis, sp. n., isolated from the bovine rumen. J. Bacteriol. 95, 1943–1951.

Pell, A. N., Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073.

Phandanouvong, V., Betancourt, L. y Rodriguez F. 2010. Determinación y cuantificación de bacterias acidolácticas por PCR en tiempo real. Rev.MVZ Córdoba 15(1):1897-1906

Pina-Vaz C1, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. 2004. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. J Eur Acad Dermatol Venereol;18(1):73-8.

Pell, a N., & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of dairy science*, *76*(4), 1063–73. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77435-4

Pellikaan, W. F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D. J. G. M., Schuppen, S. V. L., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2011). Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH4 production using an automated pressure evaluation system (APES). *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 377–390. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.072

Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. a, & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical chemistry*, *55*(5), 856–66. doi:10.1373/clinchem.2008.107565

Pinares-Patiño, C. S., Ulyatt, M. J., Waghorn, G. C., Lassey, K. R., Barry, T. N., Holmes, C. W., & Johnson, D. E. (2003). Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *The Journal of Agricultural Science*, *140*(2), 215–226. doi:10.1017/S002185960300306X

Pitta, D. W., Pinchak, E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K. (2010). Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microbial ecology*, *59*(3), 511–22. doi:10.1007/s00248-009-9609-6

Podar, M., Abulencia, C. B., Walcher, M., Hutchison, D., Zengler, K., Garcia, J. a, Holland, T., (2007). Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, *73*(10), 3205–14. doi:10.1128/AEM.02985-06

Polin, L., Raygozaa, A. Reyes., M.Díaz, L., 2014. Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu;5(1):25-47

Posada, S.L.; Noguera, R.R. Tecnica in Vitro de gases: Una herramienta para la evaluacion de alimentos para rumiantes. En: Livestock Research for Rural Development 17 (4) 2005. Medellin.

Preston TR, Leng RA. 1989. Friendly development. Livestock Research for Rural Development, 1(1), November, URL: http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd1/1/preston.htm

Primavesi O, Shiraishi RT, Dos Santos M, Aparecida M, Teresinha T, Franklin P. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. Pesq agropec bras, 39 (3): 277-283

Puchala, R., Min, B. R., Goetsch, A. L., & Sahlu, T. (2005). The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats 1, 182–186.

Ramakrishnan B, Leuders T, Dunfield PF, Conrad R, Friedrich MW (2001) Archaeal community structure in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. FEMS Microbiol Ecol 37: 175-186. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00865.x

Rea, S., Bowman, J.P., Popovski, S., Pimm, C., Wright, A.D., 2007. Methanobrevibacter millerae sp. nov. and Methanobrevibacter olleyae sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 450–456.

Relling, A, Mattioli, G. 2003. Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Argentina: UNLP Editorial Edulp.

Robinson, C. J., Bohannan, B. J. M., & Young, V. B. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *74*(3), 453–76. doi:10.1128/MMBR.00014-10

Rodicio, R. y M. M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación d e l ARNr 16S : f u n d a m e n t o , metodología y aplicaciones e n microbiología cl í n i c a. *Journal of Clinical Microbiology*, 1–7.

Rodriguez, a. G., Mandaluniz, N., Flores, G., & Oregui, L. M. (2005). A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124*, 267–276. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.035

Rodríguez CJA. 2009. Aislamiento y caracterización in vitro de una bacteria acetogénica ruminal [tesis maestría]. Montecillo, Texcoco, Estado de México: Colegio de Posgraduados.

Rojas, E., Arce, B., Peña, A., Boshell, F., & Ayarza, M. (2010). Cuantificación e interpolación de tendencias locales de temperatura y precipitación en zonas alto andinas de Cundinamarca y Boyacá (Colombia), *11*, 173–182.

Rosales, R. B. (1999). Condensed tannins in tropical forage legumes : their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships, (July).

Rouviere, P. E. and Wolfe, R. S., 1988. Novel biochemistry of methanogenesis. Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 17, pp. 7913–7916.

Russel, J. 2002. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca. N. Y. p 24-52.

Russell, J. B. and J. L. Rychlik 2001. "Factors That Alter Rumen Microbial Ecology." Science 292(5519): 1119-1122.

Russell, J. B. & Rychlik, J. L. (2001) Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. *Science,* 292, 1119-1122.

Rymer, C., Huntington, J. a., Williams, B. a., & Givens, D. I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124*, 9–30. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.055

Sakomura NK1, Longo FA, Oviedo-Rondon EO, Boa-Viagem C, Ferraudo A. 2005. Modeling energy utilization and growth parameter description for broiler chickens. Poult Sci. Sep;84(9):1363-9.

Sarah E. Hook, André-Denis G. Wright, and Brian W. McBride, "Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies," Archaea, vol. 2010, Article ID 945785, 11 pages, 2010. doi:10.1155/2010/945785

Schäfer G., Engelhard M y Muller V. 1999. Bioenergetics of the Archaea. Microbiology and molecular biology reviews. 63, 3. 570-620.

Schofield P, Pitt R E and Pell A N 1994 Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. Journal of Animal Science. 72: 2980-2991.

Schofield,P. and Pell, A.N. 1995. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in vitro: a comparision involving three forages. Journal of Dairy Science. 78: 1496-1498

Sharma, R.K. 2005. Nutritional strategies for reducing methane production by ruminants – a review. J. Res. Skuast-J 4:1.

Sheppard SK, McCarthy AJ, Loughnane JP, Gray ND, Head IM et al. (2005) The impact of sludge amendment on methanogen community structure in an upland soil. Appl Soil Ecol 28: 147-162. doi:10.1016/j.apsoil.2004.07.004.

Shibata, M., & Terada, F. (2010). Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaihō*, *81*(1), 2–10. doi:10.1111/j.1740-0929.2009.00687.x

Silva, A. T., R. J. Wallace and E. R. Orskov. 1987. Use of particlebound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. Br. J. Nutr. 57:407-415.

Skillman, L.C., Evans, P.N., Naylor, G.E., Morvan, B., Jarvis, G.N., Joblin, K.N., 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. Anaerobe 10, 277–285

Skillman, L C, Evans, P. N., Strömpl, C., & Joblin, K. N. (2006). 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in applied microbiology*, *42*(3), 222–8. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01833.x

Skillman, Lucy C, Toovey, A. F., Williams, A. J., & Wright, G. (2006). Development and Validation of a Real-Time PCR Method To Quantify Rumen Protozoa and Examination of Variability between Entodinium Populations in Sheep Offered a Hay-Based Diet. *Cloning*, *72*(1), 200–206. doi:10.1128/AEM.72.1.200

Soliva, C.R., Hindrichsen, I.K., Meile, L., Kreuzer, M., Machm¨uller, A., 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogenesis in vitro. Lett. Appl. Microbiol. 37, 35–39Somogyi N. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry. 195: 19-23.

Soliman,K.M. and R.I.Badea. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chemistry and Toxicology,40:1669-1675.

Stadtman, T.C., Barker, H.A., 1951a. Studies on the methane fermentation. VIII. Tracer experiments of fatty acid oxidation by methane bacteria. J. Bacteriol. 61, 67–80.

Stadtman, T.C., Barker, H.A., 1951b. Studies on the methane fermentation. X. A new formate-decomposing bacterium, Methanococcus vannielii. J. Bacteriol. 62, 269–280

Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR & Montgomery L (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl Environ Microb 54: 1079–1084.

Stefanon B, Pell A N and Schofield P 1996 Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. Journal of Animal Science. 74: 1104-1115.

Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., de Haan, C., 2006. Livestock's Long Shadow; Environmental Issues and Options. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, taly, 390 pp.

Stewart CS. 1991. The rumen bacteria. In: Jouany, JP. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA editions, Paris, France,; 15-26

Stewart, C. S. Bryant, M. P. 1988. The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, P.N., Stewart, C. S. (Eds.). Elsevier Science Publishing Co., Inc., NY.

Stewart, C. S.,Wolin, M. J., Miller, T. L., 1997. Microbe-microbe interactions. In: The Rumen Microbial Ecosystem Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Eds.) Blackie Academic and Professional, London.

Stewart, C. S., Flint, H. J. & Bryant, M. P. (1997) The Rumen Bacteria. *In: The Rumen Microbial Ecosystem Edited By Hobson Pn, Stewart Cs, 2 Ed. Pp. 10-72. New York: Blackie Academic And Professional;*, 10 - 72.

Sun Y, Cai Y, Huse SM, Knight R, Farmerie WG, (2011) A large-scale benchmark study of existing algorithms for taxonomy-independent microbial community analysis. Brief Bioinform 13: 107–21.

Sundset MA, Edwards JE, Cheng YF, Senosiain RS, Fraile MN,Northwood KS, Praesteng KE, Glad T, Mathiesen SD &Wright ADG (2009) Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. FEMS Microbiol Ecol 70: 553–562.

Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI & Benno Y (2000) Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. Anaerobe 6: 273–284.

Tajima, K, Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., & Benno, Y. (2001). Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied and environmental microbiology*. doi:10.1128/AEM.67.6.2766

Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., 2001. Real-Time PCR Population of the Rumen Revealed with Diet-Dependent Shifts in the Bacterial. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67(6): 2766-2774

Tajima, K, Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Aminov, R. I. (2001). Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS microbiology letters*, *200*(1), 67–72. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410351

Tajima, Kiyoshi, Y, R. I. A. Y., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., & Benno, Y. (1999). Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Cloning*, *29*.

Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Benno, Y. (2001) Diet-Dependent Shifts In The Bacterial Population Of The Rumen Revealed With Real-Time Pcr. *Appl. Environ. Microbiol.,* 67, 2766-2774.

Tajima K, Nonaka I, Higuchi K, Takusari N, Kurihara M, Takenaka A, Mitsumori M, Kailkawa H & Aminov RI (2007) Influence of high temperature and humidity on rumenbacterial diversity in Holstein heifers. Anaerobe 13: 57–64.

Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I., 2001. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. FEMS Microbiol. Lett. 200, 67–72.

Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, K. Ogata, M. Nakamura, H. Matsui, and Y. Benno. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbiol. Ecol. 29:159–169

Tan, H. Y., Sieo, C. C., Lee, C. M., Abdullah, N., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2011). Diversity of bovine rumen methanogens In vitro in the presence of condensed tannins, as determined by sequence analysis of 16S rRNA gene library. *Journal of microbiology Seoul Korea*, *49*(3), 492–498.

Tanner, G. J., Moore, a E., & Larkin, P. J. (1994). Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora in vitro. *The British journal of nutrition*, *71*(6), 947–58. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8031741

Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Waghorn, G. C., & Attwood, G. T. (2002). Methane production from in vitro incubation of kikuyu grass , lucerne and forages containing condensed tannins. *Proceeding of the New Zealand Grassland Association*, *1*, 147–153.

Takahashy, J. 2005. Emission of GhG from livestock production in Japan. 2nd International Conference on Greenhouse gases and Animal Agriculture. Soliva, C.R., Takahashi, J. &Kreuzer, M. Eds. Publication Series, Institute of animal Science, ETH Zurich, Switzerland. p. 30.

Tamminga, S. Protein degradation in the forestomachs of rumi¬nants. J. Anim. Sci. 49:1625. (Abstr.) 1979.

Tatsuoka, N., Mohammed, N., Mitsumori, M., Hara, K., Kurihara, M., Itabashi, H., 2004. Phylogenetic analysis of methyl coenzyme-M reductase detected from the bovine rumen. Lett. Appl. Microbiol. 39, 257–260.

Tedeschi, L. O., Schofield, P., & Pell, A. N. (2008). Determining feed quality for ruminants using in vitro gas production technique . 2 . Evaluating different models to assess gas production measurements, 1–15.

Tekippe, J.A. Hristov, A.N. Heyler, K.S. Cassidy, T.W. Zheljazkov V.D., Ferreira, J.F.S. Karnati, S.K. Varga G.A.. 2011. Rumen fermentation and production effects of Origanum vulgare L. leaves in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science - October 2011 (Vol. 94, Issue 10, Pages 5065-5079, DOI: 10.3168/jds.2010-4095)

Tekippe, J. A., Hristov, A. N., Heyler, K. S., Zheljazkov, V. D., Ferreira, J. F. S., Cantrell, C. L. and Varga, G. A. 2012. Effects of plants and essential oils on ruminal in vitro batch culture methane production and fermentation. Can. J. Anim. Sci. 92: 395–408.

Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature reviews. Microbiology*, *6*(8), 579–91. doi:10.1038/nrmicro1931

Thauer, R. K. 1998. "Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson." Microbiology 144: 2377-2406.

Theodorou M.K., Lowman, R. S., Davies, Z.S., Cuddeford, D., and Owen, E. 1998. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. In British Society of Animal Science. Occasional Publication Nº. 22

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

Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. Microbial informatics and experimentation, 2(1), 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3

Thornton, P. K., Van de Steeg, J., Notenbaert, a., & Herrero, M. (2009). The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know. *Agricultural Systems*, *101*(3), 113–127. doi:10.1016/j.agsy.2009.05.002

Tilley, J. M. A. and Terry, R. A.. 1963. A two-stage, technique for the in vitro digestion of forage crops. Journal British Grassland Society. 18:104.

Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K., & Kojima, Y. (1997). Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS microbiology ecology*, *22*, 127–143.

Trei, J. E., Singh, Y. K., Scott, G. C. 1970. Effect of methane inhibitors on rumen metabolism. J. Anim. Sci. 31:256.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G.,Venuti,V., Cristani, M., Daniele, D., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 2474–2478.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4606–4610.

Ultee, A., M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl. Environ. Microbiol. 68:1561–1568.

Ungerfeld, E.M., Rust, S.R. & Burnett, R. 2003. Use of some novel alternative electron sinks to inhibit ruminal methanogenesis. Reprod. Nutr. Dev. 43:189

Ushida, K., Tokura, M., Takenaka, A., Itabashi, H., 1997. Ciliate protozoa and ruminal methanogenesis. En: Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano, H., Sasaki, Y. (Eds.), Rumen Microbes and Digestive Physiology in Ruminants. Karger, Basle, Switzerland, pp. 209–220.

Van Gelder, a. H., Hetta, M., Rodrigues, M. a. M., De Boever, J. L., Den Hartigh, H., Rymer, C., Van Oostrum, M.,(2005). Ranking of in vitro fermentability of 20 feedstuffs with an automated gas production technique: Results of a ring test. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124*, 243–253. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.044

Van Kessell JS, Russell JB. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiology Ecology, 20: 205-210.

Van Krimpen, M.M., Binnendijk, G.P., 2001. Ropadiar as alternative for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs. Anim. Sci. Group Rep., 205

Van Milgen J, Murphy M R and Berger L L 1991 A compartmental model to analyze ruminal digestion. Journal of Dairy Science. 74: 2515-2529.

Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. 1994.Cornell University Press; 476 p.

Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. 2004. Cornell University Press, 1994; 476 p.

Vásquez, D. 2012. El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del alto patia: efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Tesis de maestria. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá

Vázquez, J. A., Lorenzo, J. M., Fuciños, P., & Franco, D. (2012). Evaluation of non-linear equations to model different animal growths with mono and bisigmoid profiles. *Journal of theoretical biology*, *314*, 95–105. doi:10.1016/j.jtbi.2012.08.027

Viera, D. M. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.* 63: 1547-1560.

Vieira, S. C., & Borba, A. E. S. (2011). Effects of Condensed Tannins from Quebracho Extract on the Kinetic of in vitro Gas Production on Trifolium repens , Lotus corniculatus and Lolium perenne, *1*, 982–988.

Waghorn, G C, & Mcnabb, W. C. (1990). Condensed tannins and the nutritive value of herbage. *Proceeding of the New Zealand Grassland Association*, *176*(51), 171–176.

Waghorn, G C, Tavendale, M. H., Woodfield, D. R., Grasslands, A., Bag, P., & North, P. (2000). Methanogenesis from forages fed to sheep, 167–171.

Waghorn, G.C., & Hegarty, R. S. (2011). Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 291–301. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.019 Wallace, R.J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proc. Nutr. Soc. 63, 621–629.

Wallace, R.J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proc. Nutr. Soc. 63, 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 Austral. J. Anim. 15, 1458–1468.

Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B., Newbold, C. J. (2002). Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australian Journal of Animal Science, 15 (10), 1458-1468.

Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L., Bartolo, R.G., 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and -negative bacteria. J. Appl. Microbiol. 94, 240–427.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, *73*(16), 5261–7. doi:10.1128/AEM.00062-07

Wang, CJ., Wang, SP. and Zhou, H. 2009. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. Anim Feed Sci Tech, 148:157-166.

Wang, J.-K., Ye, J.-A., & Liu, J.-X. (2012). Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance--a review. *Tropical animal health and production*, *44*(4), 697–706. doi:10.1007/s11250-011-9960-8

Weimer, P. J. (1998) Manipulating Ruminal Fermentation: A Microbial Ecological Perspective. *J. Anim Sci.,* 76, 3114-3122.5

Whitford MF, Forster RJ, Beard CE, Gong JH & Teather RM (1998) Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparativesequence analysis of cloned 16S rRNA genes. naerobe 4: 153–163.

Whitford, M. F., Teather, R. M., & Forster, R. J. (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC microbiology*, *1*, 5. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=32158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2005. Saponins containing methanol extract of Sapindus rarak affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure in vitro. Anim. Feed Sci. Technol. 121, 159–174.

Whitman WB, Boone DR, and Rouviere P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. Methanogenesis (FerryJG, ed), pp. 35–80. Chapman and Hall, New York.

Williams AG and Coleman GS 1992. The rumen protozoa. Springer-Verlag New York Inc., New York.

Williams, B. A., Tamminga, S., Verstegen, M. W. A. 2000. Fermentation kinetics to assess microbial activity of gastro-intestinal microflora. In: *Proceedings of an EAAP Satellite Symposium*. Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity. British Society of Animal Science.

Williams, B.A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: *Forage Evaluation in Ruminant Nutritio.* Givens, D.I., Owen, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK.

Williams, C. M., Eun, J.-S., MacAdam, J. W., Young, a. J., Fellner, V., & Min, B. R. (2011). Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 364–372. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.025

Williams, W. L., Tedeschi, L. O., Kononoff, P. J., Callaway, T. R., Dowd, S. E., Karges, K., & Gibson, M. L. (2010). Evaluation of in vitro gas production and rumen bacterial populations fermenting corn milling (co)products. *Journal of dairy science*, *93*(10), 4735–43. doi:10.3168/jds.2009-2920

Williams, Y. J., Popovski, S., Rea, S. M., Skillman, L. C., Toovey, A. F., Northwood, K. S., & Wright, A.-D. G. (2009). A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Applied and environmental microbiology*, *75*(7), 1860–6. doi:10.1128/AEM.02453-08

Wilmes P, Bond PL. 2006. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. Trends Microbiol, 14(2):92-97.

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 4576–4579

Wolfe, R. S. (2011). *Techniques for cultivating methanogens. Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 494, pp. 1–22). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-385112-3.00001-9

Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452–1459

Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46, 3590–3595.

Wright, A.D., Auckland, C.H., Lynn, D.H., 2007. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4206–4210.

Wright, A.D., Ma, X., Obispo, N.E., 2008. Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. Microb. Ecol. 56, 390–394.

Wright, A.D., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L., Smith, K.D., 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1263–1270

Wright, A.-D. G., Toovey, A. F., & Pimm, C. L. (2006). Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe*, *12*(3), 134–9. doi:10.1016/j.anaerobe.2006.02.002

Xin, H., J. A. DeShazer, and M. M. Beck. 1992. Energetic responses of pre-fasted growing turkeys to acute heat exposure. Transactions of the ASAE 35(1): 315-318.

Yang WZ, Benchaar C, Ametaj BN, Chaves AV, He ML, McAllister TA. 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. J Dairy Sci; (90):5671-5681.

Yang WZ, Ametaj BN, Benchaar C, Beauchemin KA. 2010. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: Ruminal and intestinal digestion. J Anim Sci;(88):680-688.

Yarlett, N., Hann, a C., Lloyd, D., & Williams, a. (1981). Hydrogenosomes in the rumen protozoon Dasytricha ruminantium Schuberg. *The Biochemical journal*, *200*(2), 365–72. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1163544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. a, Yarlett, N. C., & Greenwood, C. a. (1986). Hydrogenosomes in the rumen fungus Neocallimastix patriciarum. *The Biochemical journal*, *236*(3), 729–39. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1146905&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Yokohama, M. T., Johnson, K. A. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: *The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition*. Church, D.C. (Ed.). Prentice Hall. NJ. USA.

Youdim, K.A. and S.G. Deans, 1999. Dietary supplementation of thyme (Thymus vulgaris L.)essential oil during the lifetime of the rat: its effectson the antioxidant status in liver, kidney and hearttissues. Mechanisms of Ageing and Development,109: 163-175

Yu, Z., Forster, R.J. 2005. Nucleic acid extraction, oligonucleotide probes and PCR methods in: HPS Makkar and CS McSweeney 2005 Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants IAEA Printed in the Netherlands, 81–104.

Yu Z, Yu M & Morrison M (2006) Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. Environ Microbiol 8: 603–611.

Yu, Z., García-González, R., Schanbacher, F. L., & Morrison, M. (2008). Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, *74*(3), 889–93. doi:10.1128/AEM.00684-07

Zehnder, A. J. B. 1978. Ecology of methane formation, p. 349–376. In R. Mitchell (ed.), Water pollution microbiology, vol. 2. John Wiley & Sons, Ltd., London, United Kingdom.

Zheng, Y-G, Li, Y, Chen, J-F, Jiang, W-H, Zhao, G-P, Wang, E-D., Biotechnol Lett 23, 1781–7, 2001.

Zhou, M., McAllister, T. a., & Guan, L. L. (2011). Molecular identification of rumen methanogens: Technologies, advances and prospects. *Animal Feed Science and Technology*, *166-167*, 76–86. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.005

Zhou, M i, Hernandez-Sanabria, E., & Guan, L. L. (2009). Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and environmental microbiology*, *75*(20), 6524–33. doi:10.1128/AEM.02815-08

Zhou, Mi, Hernandez-Sanabria, E., & Guan, L. L. (2010). Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and environmental microbiology*, *76*(12), 3776–86. doi:10.1128/AEM.00010-10

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), 2634–9. doi:10.1128/AEM.02779-10

Zhu, W. Y.; Theodorou, M. K.; Nielsen, B. B. y Trinci, A. P. J. 1996. Dilution rate increases production of plant cell-wall degrading enzymes by anaerobic fungi in continuous-flow culture. Anaerobe. 3: 49-59.

Zinder, S.H. 1992. Methanogenesis. En: Encyclopedia of Microbiology, Lederberg, J. Ed. Academic Press, San Diego, vol 3, p. 81