

**Uso de compuestos bioactivos de origen vegetal para  
disminuir la metanogénesis ruminal**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Scorcione Turcato María Carolina**

**Ingeniera agrónoma - Universidad de Córdoba- 2013**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Forrajes, INTA EEA Manfredi

Laboratorio de Rumen, Instituto de Patobiología, INTA Castelar



**FAUBA** Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Dario Colombatto**

Ingeniero Agrónomo (UBA)

PhD (University of Reading, Inglaterra)

Co-director

**María Valeria Moreno**

Licenciada en microbiología (UNRC)

Doctora en Ciencias Biológicas (UBA)

Consejero de Estudios

**Julio Zygadlo**

Licenciado en biología (UNC)

Doctor en Ciencias Biológicas (UNC)

## JURADO DE TESIS

JURADO

**Rolando Barahona Rosales**

Animal Sciences and Industry, Kansas State University, EEUU

Agriculture, University of Reading, Reino Unido

JURADO

**Marcela Fernanda Martínez**

Bioquímica (Universidad Nacional del Sur)

Doctora en Agronomía (Universidad Nacional del Sur)

JURADO

**Efren Ramírez Bribiesca**

Médico Veterinario Zootecnista (Esc. Sup. De Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ac. México)

Doctor en Ciencias de la producción y salud animal (Universidad Nac. Autónoma de México)

Fecha de defensa de la tesis: 08 de julio de 2022

## **Agradecimientos**

A mi familia, pilar fundamental de mi carrera, por el enorme apoyo que siempre me han brindado, y además por ser parte del soporte emocional que necesito todo el tiempo. Sin el sacrificio y acompañamiento de mi familia, nada hubiera sido posible.

A INTA Manfredi y Castelar, gracias por brindarme un lugar y permitir mi crecimiento profesional.

A mi comité de tesis, por creer en mí a pesar de los dolores de cabeza que les generé.

A los docentes de los cursos que he tomado por compartir sus conocimientos.

Asimismo, quiero agradecer a Gaby Grandón, Eva Mamani, Georgina Frossasco, María Natalia Aznar, Abimael Ortiz, José Jere, Matías Irazoqui, Andrés Hirigoyen y Emilio Ungerfeld, por su sabiduría, tiempo y orientación.

También quiero agradecer a Chachita, Jorge, Flor, Laura, Amanda, Patita, Riqui, Pepa, Merce, Roxy, Nany, Torcuato y Seba, mis compañeros de INTA-Manfredi y a Marcos y Bernardo, compañeros de INTA-Castelar, gracias por su inmenso e impagable apoyo.

A mis amigos del pueblo y el colegio, que sin entender nada del tema me brindaron apoyo incondicional.

A Gaby, Mónica y Vanina, amigas que la vida regala.

Igualmente agradezco al CONICET por el programa de becas que hicieron posible esta tesis y al financiamiento de los Proy. Nac. INTA PNPA 1126023 y Proy. Reg. CORDO-1262205 y 1262206.

Finalmente, a todas y cada una de las personas con quienes compartí y me enseñaron muchas cosas valiosas a nivel personal y profesional.

### **Declaración**

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

## INDICE GENERAL

Agradecimientos.....	iii
Declaración.....	iv
INDICE DE CUADRO.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO 1.....	1
ANTECEDENTES GENERALES.....	2
1.1. Emisiones de gases de efecto invernadero y calentamiento global.....	2
1.1.1. Emisiones en Argentina.....	6
1.2. Rumiantes.....	7
1.2.1. Ecosistema ruminal.....	10
1.2.1.1. Bacterias.....	11
1.2.1.1.1. Bacterias fibrolíticas.....	12
1.2.1.1.2. Bacterias amilolíticas.....	13
1.2.1.1.3. Bacterias proteolíticas.....	13
1.2.1.1.4. Otras bacterias.....	13
1.2.1.2. Archaeas metanogénicas.....	14
1.2.1.3. Protozoos.....	16
1.2.1.4. Hongos.....	17
1.3. Estrategias de mitigación de CH <sub>4</sub> ruminal.....	17
1.3.1. Aproximaciones <i>in vitro</i> para el estudio de la dinámica de la fermentación.....	22
CAPÍTULO 2.....	26
EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MATERIAL VEGETAL Y SUS EXTRACTOS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL.....	27

2.1. Introducción.....	27
2.2. Hipótesis.....	29
2.3. Materiales y métodos.....	29
2.3.1. Material vegetal.....	29
2.3.2. Obtención de los extractos vegetales.....	30
2.3.3. Incubación <i>in vitro</i> .....	31
2.3.4. Análisis químico del material vegetal, de los extractos, variables y parámetros bioquímicos de fermentación.....	33
2.3.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
2.4. Resultados.....	36
2.4.1. Composición química del material vegetal y sus extractos.....	36
2.4.2. Producción de gas, concentración de metano y degradabilidad <i>in vitro</i> del sustrato.....	37
2.4.3. Parámetros bioquímicos de la fermentación <i>in vitro</i> .....	44
2.5. Discusión.....	48
2.6. Conclusión.....	54
CAPTÍTULO 3.....	56
EFECTO DE LOS POLIFENOLES DE <i>LIPPIA TURBINATA</i> Y <i>TAGETES MINUTA</i> SOBRE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL <i>IN VITRO</i> DE DOS DIETAS CONTRASTANTES.....	57
3.1. Introducción.....	57
3.2. Hipótesis.....	58
3.3. Materiales y métodos.....	58
3.3.1. Material vegetal y obtención de extractos vegetales.....	58
3.3.2. Incubación <i>in vitro</i> .....	58
3.3.3. Análisis químico del material vegetal, de los extractos, variables y parámetros bioquímicos de fermentación.....	59
3.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico.....	62

3.4. Resultados.....	63
3.4.1. Determinación de fenoles totales (FT), fenoles no tánicos (FNT) y taninos totales (TAN).....	63
3.4.2. Producción de gas, concentración de metano y degradabilidad <i>in vitro</i> de los sustratos.....	65
3.4.3. Parámetros bioquímicos de la fermentación <i>in vitro</i> .....	71
3.5. Discusión .....	73
3.6. Conclusión.....	80
CAPÍTULO 4. ....	82
EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>LIPPIA TURBINATA</i> Y <i>TAGETES MINUTA</i> MOLIDOS SOBRE LAS VARIABLES DE FERMENTACIÓN Y LAS POBLACIONES MICROBIANAS RUMINALES A TRAVÉS DEL TIEMPO.....	83
4.1. Introducción.....	83
4.2. Hipótesis .....	84
4.3. Materiales y Métodos.....	84
4.3.1. Tratamientos .....	84
4.3.2. Incubación <i>in vitro</i> .....	84
4.3.3. Análisis químicos del material vegetal, variables de fermentación y parámetros bioquímicos .....	85
4.3.4. Extracción de ADN genómico .....	85
4.3.5. Amplificación por qPCR .....	86
4.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico .....	88
4.4. Resultados.....	88
4.4.1. Producción de gas, concentración de metano y degradabilidad <i>in vitro</i> del sustrato .....	88
4.4.2. Parámetros bioquímicos de la fermentación <i>in vitro</i> .....	91
4.4.3. Cuantificación de las poblaciones de bacterias y metanógenos totales.....	92
4.5. Discusión .....	94

4.6. Conclusión.....	97
CAPÍTULO 5. ....	99
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES	100
BIBLIOGRAFÍA .....	106
ANEXO.....	131



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Composición química del material vegetal y los extractos (en g/kg MS) .....	37
<b>Cuadro 2:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad <i>in vitro</i> del sustrato en relación a la D0. ....	39
<b>Cuadro 3:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad <i>in vitro</i> del sustrato en relación a la D0. ....	40
<b>Cuadro 4:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT sobre el pH, la producción de AGV, cantidad de protozoos, el contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en relación a la D0.....	46
<b>Cuadro 5:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de TM sobre el pH, la producción de AGV, cantidad de protozoos, el contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en relación a la D0.....	47
<b>Cuadro 6:</b> Cuantificación de fenoles totales (FT, mg AT eq/g MS); fenoles no tánicos (FNT, mg AT eq/g MS) y taninos totales (TAN, mg AT/g MS) sobre el material vegetal, los extractos y los componentes de los sustratos.....	64
<b>Cuadro 7:</b> Aporte de fenoles (mg AT eq/g MS) de los sustratos, el material vegetal y los extractos. ....	65
<b>Cuadro 8:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT y TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad <i>in vitro</i> del sustrato Pan en relación a la D0. ....	67
<b>Cuadro 9:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT y TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad del sustrato TMR en relación a la D0. ....	70
<b>Cuadro 10:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de sobre el pH, protozoos, contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en el sustrato Pan en relación a la D0... ..	72
<b>Cuadro 11</b> Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de sobre el pH, protozoos, contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en el sustrato TMR en relación a la D0 .....	72
<b>Cuadro 12:</b> Especificaciones de cebadores para bacterias y <i>archaeas</i> metanógenicas totales....	87
<b>Cuadro 13:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal de LT y TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad del sustrato de TMR a la hora 12, 24 y 48 en relación a la D0. ..	89
<b>Cuadro 14:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal de LT y TM sobre el pH, protozoos, contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en el sustrato TMR a la hora 12, 24 y 48 en relación a la D0.....	92
<b>Cuadro 15:</b> Efecto de la inclusión de material vegetal sobre las poblaciones de bacterias totales y metanógenos totales en los horarios 0, 12, 24 y 48 h (valores expresados en log <sub>10</sub> ) en relación a la D0.....	93

<b>Cuadro 16:</b> Características de las principales bacterias ruminales.....	131
<b>Cuadro 17:</b> Características de las principales <i>archaeas</i> ruminales. ....	133
<b>Cuadro 18:</b> Características de los géneros protozoarios ruminales.....	134
<b>Cuadro 19:</b> Ingredientes y composición química del sustrato utilizado en g/kg MS .....	135
<b>Cuadro 20:</b> Ingredientes y composición química de la dieta de los animales en g/kg MS .....	135
<b>Cuadro 21:</b> Ingredientes y composición química de los sustratos Pan y TMR en g/kg MS.....	135
<b>Cuadro 22:</b> Ingredientes y composición química de la dieta de los animales en g/kg MS (ensayo presentado en Capítulo 3).....	135
<b>Cuadro 23:</b> Ingredientes y composición química de la dieta de los animales en g/kg MS (ensayo presentado en Capítulo 4).....	136

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquematación del efecto invernadero .....	3
<b>Figura 2:</b> Emisiones antropogénicas totales anuales de GEI (Gg CO <sub>2</sub> -eq/año: gigagramos de equivalente de CO <sub>2</sub> por año) para el período 1970 a 2010. ....	5
<b>Figura 3:</b> Metabolismo y degradación de los carbohidratos estructurales por parte de los microorganismos que habitan en el rumen .....	8
<b>Figura 4:</b> a) Reducción relativa respecto al control de la producción de metano (mL/gMSi) y la degradabilidad de la MSi del sustrato (g/g). b) Reducción relativa respecto al control de la producción demetano (mL/gMOi) y la degradabilidad de la MOi del sustrato (g/g) .....	41
<b>Figura 5:</b> Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para LT. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2. ....	42
<b>Figura 6:</b> a) Reducción relativa respecto al control de la producción de metano (mL/gMSi) y la degradabilidad de la MSi del sustrato (g/g). b) Reducción relativa respecto al control de la producción demetano (mL/gMOi) y la degradabilidad de la MOi del sustrato (g/g) .....	43
<b>Figura 7:</b> Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para TM. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2. ....	44
<b>Figura 8:</b> Contenidos de FT, FNT y TAN en % para el material vegetal, los extractos y los componentes de los sustratos. ....	64
<b>Figura 9:</b> Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para el sustrato Pan. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2. ....	68
<b>Figura 10:</b> Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para el sustrato TMR. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2. ....	69
<b>Figura 11:</b> Protozoos ciliados observados en microscopio. a) <i>Isotrichia</i> y <i>Entodinomorfos</i> en D0 a las 48 h; b) <i>Entodinium</i> en MON a las 48 h.....	91
<b>Figura 12:</b> Comparación de bacterias totales y <i>archaeas</i> metanogénicas a las 0, 12, 24 y 48 h con los tratamientos D0 (Dosis 0), MON (monensina), SM1 (suico molido 1 g/L) y PM1 (poleo molido 1 g/L) .....	94

## ABREVIATURAS

%CH<sub>4</sub>: Porcentaje de metano

%DMO: Degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica expresado en porcentaje

%DMS: Degradabilidad *in vitro* de la materia seca expresado en porcentaje

°C: Grados centígrados

A/P: Relación acetato propionato

ACP: Análisis de componentes principales

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE: Aceites esenciales

AGV: Ácidos grasos volátiles

AOAC: Association of Official Agricultural Chemist

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

AT: Ácido tánico

Cen: Cenizas

CH<sub>4</sub>: Metano

cm: Centímetros

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CP1: Componente principal 1

CP2: Componente principal 2

D0: Dosis cero

dL: Decilitros

DMS<sub>iv</sub>: digestibilidad *in vitro* de la materia seca

EE: Error estándar de la media

EPA: United States Environmental Protection Agency

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Fibra en detergente ácido

FDN d: Degradabilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro expresada en gramo/gramo

FDN: Fibra en detergente neutro

FNT: Fenoles no tánicos

FP: Factor de partición

FR: Fluido ruminal

FT: Fenoles totales

g degr: Gramos degradados

g inc: Gramos incubados

g: Gramos

GC: Cromatografía gaseosa

GEI: Gases de efecto invernadero

GgCO<sub>2</sub>-eq/año: Gigagramos de equivalente de CO<sub>2</sub> por año

h: Hora

H<sub>2</sub>: Hidrógeno

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IPCC: The Intergovernmental Panel on Climate Change

Kg: Kilogramos

L: Litros

LT: *Lippia turbinata* G.

MFDNi: Metano en relación a la fibra en detergente neutro incubada

mg: Miligramos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

MMOi: Metano en relación a la materia orgánica incubada

MMSi: Metano en relación a la materia seca incubada

MO d: Degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica expresado en gramo/gramo

MO: Materia orgánica

MOi: Materia orgánica incubada

MON: Monensina

MS d: Degradabilidad *in vitro* de la materia seca expresado en gramo/gramo

MS: Materia seca

MSi: Materia seca incubada

N: Normal

N<sub>2</sub>: Nitrógeno

N<sub>2</sub>O: Óxido nitroso

NaCl: Cloruro de sodio

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

N-NH<sub>3</sub>: Nitrógeno amoniacal

O<sub>2</sub>: Oxígeno

p/v: Peso/volumen

*p-value*: Valor de significancia

PA: Poleo en acetona

PAG: Poleo en agua

PAL: Poleo en alcohol

Pan: *Panicum coloratum*

PB: Proteína bruta

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PE: Poleo en éter

PGMO: Producción de gas relacionada a la materia orgánica incubada

PGMS: Producción de gas relacionada a la materia seca incubada

pH: Potencial de hidrogeniones

PM: Poleo molido

qPCR: Polymerase chain reaction quantitative (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo)

RBB+C: Repeated Bead Beating plus Column (Golpes de cuentas repetidos más columna)

SA: Suico en acetona

SAG: Suico en agua

SAL: Suico en alcohol

SE: Suico en éter

seg: Segundos

SF<sub>6</sub>: Hexafluoruro de azufre

SM: Suico molido

TAE: Tris Acetato EDTA

TAN: Taninos totales

TM: *Tagetes minuta* L.

TMR: Dieta totalmente mezclada

tn: Toneladas

v/v: Volumen/volumen

V: Volt

vs: Versus

μL: Microlitros

μm: Micrómetros

## RESUMEN

La fermentación entérica del rumiante es una de las principales fuentes de CH<sub>4</sub>, un gas de efecto invernadero, que representa una pérdida de energía para el animal. Existen especies vegetales con propiedades antimicrobianas utilizadas como modificadores de este proceso. El objetivo de esta Tesis fue determinar si compuestos bioactivos provenientes de *Lippia turbinata* G. (LT) y *Tagetes minuta* L. (TM) evaluados en ensayos *in vitro*, modulan el ecosistema ruminal y disminuyen las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico. Inicialmente, se realizó una evaluación de extractos y materiales molidos de estas especies a diferentes dosis en una dieta base que inhiban la metanogénesis sin afectar la degradabilidad del sustrato. Las reducciones en las emisiones de CH<sub>4</sub> se lograron con PAL1 y SE1, afectando este último la degradabilidad del sustrato. Los extractos seleccionados se probaron en dos dietas contrastantes simulando sistemas de cría y tambo. En el primero, el CH<sub>4</sub> disminuyó sólo con las dosis mayores de los tratamientos evaluados, mientras que en el sistema de tambo todos lograron reducirlo. También se cuantificaron compuestos fenólicos de los extractos, del material molido y de los sustratos utilizados. Éstos fueron superiores para TM con respecto a LT, mostrando que el modo de acción de los mismos depende de su perfil y de las relaciones generadas con los sustratos. Por último, se evaluaron los materiales vegetales de las especies estudiadas sobre las poblaciones de *archaeas* metanogénicas, bacterias totales y protozoos en el sistema de tambo a través del tiempo mediante qPCR y conteo al microscopio. Ambas alteraron la dinámica de fermentación y redujeron la producción de CH<sub>4</sub>, pero de manera diferencial. LT redujo las poblaciones de metanógenos mientras que TM no afectó a estos microorganismos. Asimismo, no fue posible establecer una relación directa entre la reducción del número de metanógenos con la población de protozoos. Los cambios poblacionales de bacterias totales no tuvieron relevancia biológica. La incorporación de estos aditivos en las dietas de los sistemas planteados representa una estrategia de adopción potencial para reducir las emisiones de metano.

**Palabras clave:** poleo, suico, metano, fenoles, qPCR



## ABSTRACT

The enteric fermentation of ruminant is one of the main sources of CH<sub>4</sub>, a greenhouse gas, which represents a loss of energy for the animal. There are plant species with antimicrobial properties used as modifiers of this process. The objective of this Thesis was to determine if bioactive compounds from *Lippia turbinata* G. (LT) and *Tagetes minuta* L. (TM) evaluated in *in vitro* assay, modulate the ruminal ecosystem and reduce enteric CH<sub>4</sub> emissions. Initially, a screening of extracts and ground materials of these species was carried out at different doses in a base diet that inhibit methanogenesis without affecting substrate's degradability. Reductions in CH<sub>4</sub> emissions were achieved with PAL1 and SE1, the latter affecting substrate degradability. The selected extracts were tested in two contrasting diets simulating breeding and dairy systems. The first, CH<sub>4</sub> decreased only with the higher doses of the treatments, while in dairy systems, all of these reduce it. Also, phenolic compounds of the extracts, the ground material and the substrates used were quantified. These were superior for TM with respect to LT where the mode of action depends on their profile and the relationships generated with the substrates. Finally, plant materials of the studied species were evaluated on the populations of methanogenic *archaea*, total bacteria and protozoa in dairy substrate, over time using qPCR and microscopic counting. Both altered the fermentation dynamics, reduced CH<sub>4</sub> production, through differential ways. LT reduced the populations of methanogens while TM did not affect these. Likewise, it was not possible to establish a direct relationship between reduction in the quantity of methanogens with the protozoan population size. Population changes of total bacteria had not biological relevance. The incorporation of these additives in diets of the proposed systems represents a potential adoption strategy on reduction of methane emissions.

**Keywords:** poleo, suico, methane, phenols, qPCR

## **CAPÍTULO 1**

## ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1. Emisiones de gases de efecto invernadero y calentamiento global

En los últimos años, el incremento de la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera terrestre ha sido foco de atención por la comunidad científica. El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos y hexafluoruro de azufre son los GEI más importantes monitoreados por la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático y listados en el Protocolo de Kioto (Anexo A) (Sagrera, 2011).

De toda la energía radiante que llega procedente del sol, aproximadamente el 30% es reflejado al espacio (albedo), el 50% es absorbido en la superficie terrestre y el 20% restante es absorbido por la atmósfera (Santamaria, 2010). Esta absorción se debe a constituyentes menores de la atmósfera: CO<sub>2</sub> (0,03 %), CH<sub>4</sub> (1,5 x 10<sup>-4</sup> %) y N<sub>2</sub>O (3 x 10<sup>-5</sup> %), dado que los mayores componentes como el nitrógeno (N<sub>2</sub>, 78 %), oxígeno (O<sub>2</sub>, 21%) y argón (Ar, 0,94%), son transparentes al espectro solar (IPCC, 2007; Santamaria, 2010). Esta transformación de la luz solar en radiación de menor energía como la infrarroja que se refleja nuevamente a la atmósfera por estos gases y vapor de agua, entre otros, es la principal fuente de calor y a lo que se llama efecto invernadero (Figura 1; Caballero *et al.*, 2007). Si bien, estos gases minoritarios contribuyen con una porción muy pequeña de los gases en la atmósfera terrestre (<1%), juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la temperatura atmosférica adecuada para los ecosistemas (Sejian, 2011).



**Figura 1:** Esquematación del efecto invernadero. Tomado de: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2017.

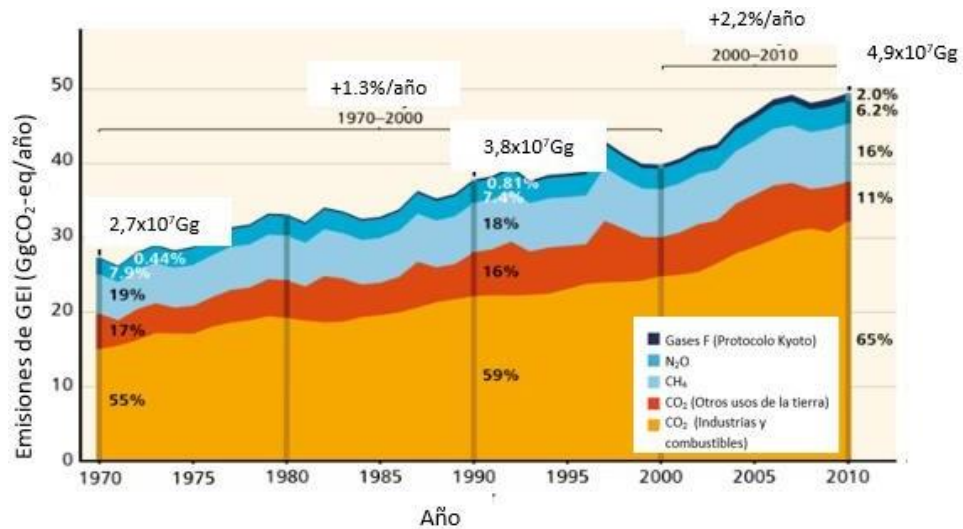
La temperatura media del planeta se ha incrementado entre 0,5 y 1 °C, según se tomen las temperaturas registradas entre 1961 a 1990, o se consideren desde la mitad del siglo XIX en adelante (Brohan *et al.*, 2006; Caballero *et al.*, 2007). Con base en los registros disponibles, los años más cálidos se han concentrado desde 1980 en adelante, (Sejian, 2011) con un aumento estimado entre 1,8 y 3,9 °C hacia el año 2100 (IPCC, 2007).

El crecimiento de la población mundial y el aumento del poder de compra han promovido un rápido aumento de la demanda de alimentos de origen animal. Se espera que la demanda mundial de carne y leche aumente en un 73% y un 58%, respectivamente, para 2050 en comparación con los niveles de 2010, debido a la expansión continua de la población mundial, una clase media emergente, ingresos crecientes y urbanización. (Gerber *et al.*, 2013). Además, se suma a la amenaza la dramática expansión en la producción de cultivos para biocombustibles, la cual ya está impactando en los recursos disponibles a nivel mundial para la producción de alimentos, y por lo tanto, en el suministro de alimentos y su costo (FAO, 2017). La seguridad alimentaria sigue siendo

una de las cuestiones de mayor prioridad en los países en desarrollo, y la producción de ganado tiene un papel clave en muchos de estos países (Sejian, 2011). En este contexto, América Latina ocupa un lugar destacado como proveedor de proteínas animales para el mundo (FAO, 2010).

El gas que más contribuye con las emisiones fue el CO<sub>2</sub> con un 77% del total de emisiones derivadas de actividades humanas (antropogénicas), mientras que el CH<sub>4</sub> se ubicó como segundo contribuyente (16%) (IPCC, 2013). Las emisiones de GEI a nivel global debidas a estas actividades se han elevado aproximadamente 70% desde el comienzo de la revolución industrial entre 1970 y 2004 (Preston *and* Leng, 1989; IPCC, 2007). De todos modos, se ha reportado que la absorción de radiación del CH<sub>4</sub> es 21 a 28 veces mayor que el CO<sub>2</sub> por lo que una pequeña concentración de CH<sub>4</sub> tiene mayor capacidad de elevar la temperatura de la atmósfera (Kruger *et al.*, 2006; IPCC, 2007). Se estima que su vida media en la atmósfera es de 12 años y su concentración aumenta un 7% por año (50 a 200 años si se compara con CO<sub>2</sub>), convirtiéndolo en un gas importante a la hora de considerar el potencial de calentamiento (IPCC, 2006; Cottle *et al.*, 2011).

Si bien son muchas las causas que contribuyen con la emisión de GEI hacia la atmósfera, la contribución por actividades antropogénicas es considerada como el principal agente del aumento pronunciado en las últimas décadas (Caballero *et al.*, 2007). A lo largo de 30 años (1970-2000) las emisiones globales antropogénicas aumentaron a razón de 1,3 % GgCO<sub>2</sub>-eq/año, mientras que desde el año 2000 al 2010 las emisiones se incrementaron de aproximadamente  $3,8 \times 10^7$  GgCO<sub>2</sub>-eq a  $4,9 \times 10^7$  GgCO<sub>2</sub>-eq (2,2% GgCO<sub>2</sub>-eq/año; Figura 2). En este sentido, Sejian (2011) establece que el foco debería concentrarse no solo en cuánto la tierra se está calentando, sino en la rapidez con la que lo está haciendo.



**Figura 2:** Emisiones antropogénicas totales anuales de GEI (GgCO<sub>2</sub>-eq/año: gigagramos de equivalente de CO<sub>2</sub> por año) para el período 1970 a 2010. Adaptado de IPCC, 2013.

El sector agrícola ganadero aporta entre 10 y 12% de las emisiones de los principales GEI, alcanzando aproximadamente el 50% del CH<sub>4</sub> y el 60 a 80% del N<sub>2</sub>O producido (IPCC, 2014). Las principales fuentes de emisión en este sector son el N<sub>2</sub>O liberado de los suelos relacionados con la aplicación de fertilizantes nitrogenados (38%), el CH<sub>4</sub> de la fermentación entérica del ganado (25%), el cultivo de arroz (11%), además del CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O provenientes del manejo del estiércol (15%) y de la quema de pastizales, bosques y residuos agrícolas (13%) (EPA, 2006). Asimismo, el sector agrícola es indirectamente responsable de las emisiones generadas por el sector industrial y energético a través de la producción de insumos como fertilizantes y pesticidas, la producción y operación de maquinaria agrícola y el uso de energía en los establecimientos (West and Marland, 2002). Desde el año 2000 las emisiones asociadas directamente con la producción animal han aumentado alrededor de 1,1% por año, debido a un crecimiento constante de la demanda de productos de origen animal. Las emisiones de GEI en los sistemas ganaderos implican pérdidas de nitrógeno, materia orgánica y energía, con una consecuente disminución de la eficiencia del sector (IPCC, 2014).

### 1.1.1. Emisiones en Argentina

Las emisiones de GEI en Argentina entre los años 1990 y 2012 se incrementaron 62,6%, alcanzando 368295 GgCO<sub>2</sub>-eq en 2014. El principal GEI emitido por el país fue el CO<sub>2</sub> (67%), seguido por el CH<sub>4</sub> (21%) y el N<sub>2</sub>O (12%). El sector con mayores emisiones de GEI correspondió al de Energía (52,5%), seguido del sector Agricultura y Ganadería con 39,2%. En este último sector, se produjo el 70% del CH<sub>4</sub>, de los cuales el 98% se originó por la fermentación entérica. Asimismo, este mismo sector generó el 94% de N<sub>2</sub>O como consecuencia de emisiones provenientes de los suelos agrícolas (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2017).

La cantidad de cabezas de ganado bovino en Argentina es de aproximadamente 52 millones de animales, de los cuales 50 millones corresponden al ganado de carne y el resto a vacas en ordeño (SENASA, 2013). De todos modos, las emisiones de GEI provenientes del sector ganadero, no tienen aún una incidencia directa en el valor de la carne, ni en la definición de políticas sectoriales de mitigación. Sin embargo, se espera que los países desarrollados que compren alimentos de Argentina, trasladen las obligaciones de reducción de emisiones a los países oferentes de los productos agrícolas y ganaderos (Basso *et al.*, 2013).

La emisión de CH<sub>4</sub> desde el animal se estima como una pérdida de energía que puede oscilar entre 2% y 15% de la energía bruta (Johnson *and* Johnson, 1995). Por ello, el desarrollo de estrategias para disminuir estas emisiones en el rumen puede contribuir, tanto a mitigar sus efectos en el calentamiento global, como a beneficiar la producción ganadera eficientizando a los animales en el uso de la energía contenida en los alimentos (Benaouda *et al.*, 2017).

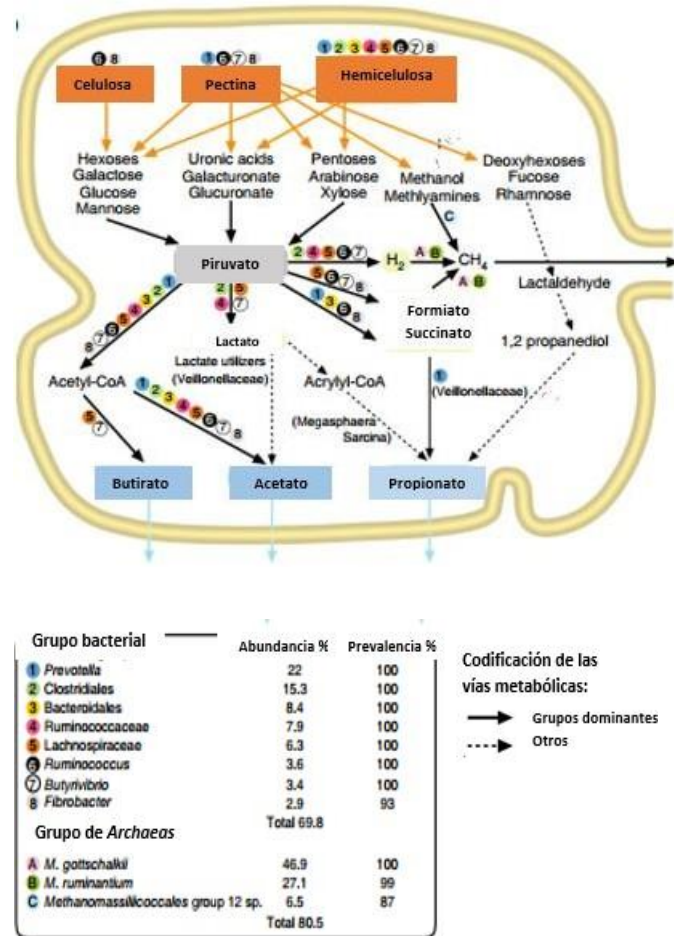
La comprensión del mecanismo de metanogénesis sería una adecuada herramienta usada como estrategia de mitigación para asegurar una intervención

específica sobre los organismos metanógenos y mantener las funciones normales de otros microbios en el rumen (Qiao *et al.*, 2014). En este contexto se requiere una visión global que ayude a entender dónde un sistema productivo basado en el ganado es beneficioso y dónde se transforma en un problema para alcanzar los objetivos de los ecosistemas y medios de vida resilientes y globales (Herrero *et al.*, 2011).

## **1.2. Rumiantes**

Tanto los mamíferos, como otros grupos de animales, no son capaces de degradar la celulosa, principal polisacárido presente en los vegetales. Por ello, se establecen relaciones de carácter simbiótico con microorganismos, como es el caso del rumen, cuyo ecosistema microbiano complejo participa en la fermentación de los polisacáridos vegetales (Figura 3; Russell *and* Rychlik, 2001; Madigan *et al.*, 2004). Se genera una relación de mutualismo entre la comunidad microbiana ruminal y el animal hospedero, donde los microorganismos se encargan de la digestión anaerobia de los componentes de la pared celular de los vegetales, la síntesis de proteínas y de vitaminas. A su vez el animal provee el medio adaptado para el mantenimiento de esta compleja comunidad (Castillo-González *et al.*, 2014). La acción enzimática de los microorganismos permite la degradación del alimento hasta llegar a los monómeros constituyentes del material vegetal, lo cual mejora la degradabilidad de los sustratos lignocelulósicos (Leonowicz *et al.*, 1999). Este proceso ocurre en la parte anterior del tracto y es denominado fermentación entérica (Relling *and* Mattioli, 2003).





**Figura 3:** Metabolismo y degradación de los carbohidratos estructurales por parte de los microorganismos que habitan en el rumen. Adaptado de: Seshadri *et al.*, 2018.

El rumen requiere, para funcionar adecuadamente, el aporte constante de un medio que asegure el crecimiento de los microorganismos y una continua fermentación. Tanto el pH de la ingesta como el del fluido ruminal se mantienen a nivel relativamente constante debido al ingreso del alimento, agua y saliva, la cual posee propiedades amortiguadoras principalmente por el bicarbonato presente en ella (Castillo-González *et al.*, 2014). El pH oscila entre 5,5 a 7 (Krause *and* Oetzel, 2006), el cual depende de la producción de saliva, de la generación y absorción de AGV (ácidos grasos volátiles), del tipo y la cantidad de alimento ingerido, del intercambio de bicarbonatos y fosfatos generados por la saliva a través del epitelio ruminal (Aschenbach *et al.*, 2011). La temperatura del rumen se mantiene en el rango de 39 °C a 39,5 °C (Relling *and* Mattioli,

2003), pudiendo incrementarse a 41 °C inmediatamente después que el animal ha comido, debido a que los procesos de fermentación producen calor (Brod *et al.*, 1982).

El suministro de alimento, la remoción de productos de fermentación y la temperatura se mantienen casi sin variaciones (Bryant, 1959; Mackie *et al.*, 2000). La velocidad con la que pasa el alimento depende del tipo de dieta, variando el tiempo de retención en el retículo-rumen desde 10 a 24 h para el agua, los microorganismos y los componentes más solubles; hasta 30-50 h para aquellos más insolubles o de baja digestibilidad (Relling *and* Mattioli, 2003). A partir de la fermentación de los azúcares que componen la fibra vegetal se forman AGV, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y un aumento en la temperatura (McAllister *et al.*, 1996). Los AGV principales son el ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, que constituyen la mayor fuente de energía para el animal y son absorbidos a través del epitelio ruminal. La proporción sintetizada de cada uno de ellos dependerá del tipo de alimento que haya consumido el animal (Relling *and* Mattioli, 2003).

La eliminación de los gases que se producen a diario (principalmente CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) se realiza por medio del orificio retículo ruminal y del cardias debido a las contracciones ruminales, a través de las vías respiratorias. Mientras que, por medio del aparato digestivo, se expulsa la fracción del alimento que no ha sido degradado aún y que debe continuar con su tránsito (Relling *and* Mattioli, 2003). En cuanto a los AGV e iones hidrógeno formados, se deben retirar del rumen para evitar una acumulación excesiva en la presión osmótica y valores de pH que puedan resultar nocivos; esta eliminación se realiza mediante la absorción de las paredes del rumen y la formación de metano respectivamente (Relling *and* Mattioli, 2003). Las fermentaciones entéricas del ganado originan el 25% de las emisiones de CH<sub>4</sub> (Olivier *et al.*, 2005; Sejian, 2011). En los rumiantes se produce aproximadamente el 89% del CH<sub>4</sub> en el rumen, de los cuales, el

90% se excreta a través de la eructación y el resto a través del ano (Murray *et al.*, 1976; Bertrand *and* Hacala, 2007).

### **1.2.1. Ecosistema ruminal**

El ecosistema ruminal se compone de un amplio rango de microorganismos que se encuentran en una relación simbiótica en un ambiente estrictamente anaeróbico (Ozutsumi *et al.*, 2005). Esta interacción entre los microorganismos y el animal hospedero permite a los rumiantes poder digerir dietas ricas en fibra y de baja proteína (Castillo-González *et al.*, 2014). La estructura de la comunidad microbiana del rumen posee una gran flexibilidad para adaptarse ante cambios en el medio, lo que le brindaría al animal huésped tanto estabilidad como la capacidad de aprovechar diferentes vegetales como alimentos (Henderson *et al.*, 2015). Esta comunidad es compleja y está compuesta por microorganismos como bacterias, protozoos, hongos y *archeas* metanogénicas, que conforman una unidad ecológica altamente integrada con un rol fundamental en la nutrición y bienestar del animal (Van Soest, 1994). La asociación rumiante-microbioma es considerada como un superorganismo (Morgavi *et al.*, 2013), dejando en evidencia la influencia recíproca entre la condición fisiológica de un animal y su ecosistema microbiano.

Dentro del rumen, los microorganismos ruminales se distribuyen en tres ambientes diferentes. Algunos están libres en el líquido ruminal, otros están unidos a sustratos insolubles y los restantes adheridos al epitelio ruminal. Al ser ambientes tan diversos, tanto las comunidades que los habitan como los productos que se generan son diferentes (Cheng *et al.*, 1979; Olubobokun *and* Craig, 1990; Larue *et al.*, 2005). Sin embargo, más allá de la complejidad de este ecosistema, el mismo puede ser manipulado para mejorar la eficiencia de conversión del alimento en productos de interés humano, lo

cual constituye desde hace tiempo uno de los principales objetivos de nutricionistas y microbiólogos (Martin, 1998).

#### **1.2.1.1. Bacterias**

Constituyen la población predominante en el rumen ( $10^4$ - $10^{11}$  células/g de contenido ruminal), pudiendo representar entre 50 y 60% de la masa microbiana total (Wolin *et al.*, 1997; Mackie *et al.*, 2000; Nagaraja *and* Titgemeyer, 2007). Este grupo comprende más de 200 especies (McSweeney *et al.*, 2005), pero solo 20 géneros son los responsables de la mayor cantidad de reacciones dentro del rumen. Las bacterias se caracterizan por presentar plasticidad dado que cuando se incluye un nuevo componente en la dieta, son capaces de redireccionar la fermentación (Puniya *et al.*, 2015). Los grupos filogenéticos predominantes en la microbiota bacteriana pueden representar hasta el 80% del total de bacterias y son tres: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (Brulc *et al.*, 2009; Nathani *et al.*, 2015).

La población bacteriana total se divide en tres grupos de acuerdo a su ubicación: en la parte líquida, asociadas a partículas de alimento y adheridas al epitelio ruminal (Miron *et al.*, 2001). El primer grupo (alrededor de 18%) está compuesto por bacterias libres en el fluido ruminal que consumen los componentes solubles (McAllister *et al.*, 1994). El segundo grupo (70-80%) representa el 90% de la actividad endoglucanasa y xilanasa, así como el 70-75% de la actividad amilasa y proteasa del rumen (Miron *et al.*, 2001). El tercer grupo (1-2%) (Cheng *et al.*, 1980; Russell *and* Montovani, 2002), es muy diverso y puede estar asociado a la superficie de protozoarios y hongos (Miron *et al.*, 2001). Se encuentra relacionado con las actividades metabólicas del huésped como la captación de oxígeno, el reciclado de tejido (Cheng *et al.*, 1980) y la hidrólisis de la urea que ingresa al rumen a través de la pared (Wallace *et al.*, 1979).

Los principales géneros bacterianos ruminales se muestran en la Cuadro 16 del Anexo. Los requerimientos generales para crecer y desarrollarse son presencia de bajo potencial redox, rango de pH de 5,5-6,9 y temperatura de 39 °C (Puniya *et al.*, 2015). La competencia entre bacterias dentro del rumen está condicionada por varios factores tales como la preferencia por ciertos sustratos, los requerimientos de energía y la resistencia a ciertos productos metabólicos tóxicos (Russell *and* Montovani, 2002). Una de las formas más habitual y difundida de clasificar las bacterias se basa en el sustrato principal que utilizan, ya sea fibras, almidón, proteínas y otros posibles (Yokohama *and* Jonhson, 1988). Con base en ello se detallan a continuación los siguientes grupos:

#### **1.2.1.1.1. Bacterias fibrolíticas**

Dentro de este grupo de bacterias, las especies celulolíticas más importantes son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococci albus*, que originan diferentes productos de fermentación específicos (Cuadro 16 del Anexo) (Naas *and* Pope, 2019).

La fibra vegetal está compuesta por una compleja matriz de polímeros la cual requiere la acción en conjunto de una amplia gama de enzimas hidrolíticas (Koike *and* Kobayashi, 2009). El proceso de degradación de la fibra depende principalmente del tipo de forraje, la madurez del cultivo y los miembros de las comunidades bacterianas presentes (Fondevila *and* Dehority, 1996). Esto se desarrolla gracias a la proliferación de bacterias que se adhieren al sustrato, lo que les permite ingresar e invadir los tejidos vegetales formando microcolonias (Cheng *et al.*, 1980). Como principales productos se producen AGV, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, donde los primeros cubren el 70% de las necesidades energéticas del rumiante (Hill *and* Wyse, 2006). Estos AGV están compuestos por ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico en una relación aproximada de 70:20:10 (Lana *et al.*, 1998; Bannink *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.1.2. Bacterias amilolíticas**

Las especies *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminnantium*, *Succinomonas amylofítica* y *Streptococci bovis* son las que se encuentran con más frecuencia digiriendo el almidón en el rumen (Puniya *et al.*, 2015) (Cuadro 16 del Anexo).

Los productos de fermentación que se obtienen a partir del almidón son AGV, principalmente ácido propiónico (Relling *and* Mattioli, 2003). Estas bacterias tienen menos sensibilidad a los cambios de pH que los otros grupos, pudiendo crecer en un rango entre 5,5 y 6 (Mould *and* Ørskov, 1983).

#### **1.2.1.1.3. Bacterias proteolíticas**

*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides rumenicola* y *amylophilus* son las especies más importantes que degradan proteínas (Cuadro 16 del Anexo). Los péptidos llegan intactos al abomaso o se hidrolizan en el rumen para obtener aminoácidos, quienes pueden ser convertidos en AGV, CO<sub>2</sub> y amoníaco (NH<sub>3</sub>), o ser utilizados por los microorganismos del rumen para la síntesis de sus propias proteínas (Mackie *and* White, 1990).

#### **1.2.1.1.4. Otras bacterias**

En los rumiantes donde la dieta está compuesta por un gran porcentaje de granos (Brown *et al.*, 2006), las bacterias que degradan el lactato tienen un rol importante, ya que metabolizan el ácido láctico controlando su acumulación y manteniendo el pH ruminal (Mackie *and* Heath, 1979). Además, el lactato es un producto intermediario en la fermentación ruminal, el cual es metabolizado a AGV (Castillo-González *et al.*, 2014). *Megasphaera elsdenii* es la principal especie responsable de este proceso, constituyendo un rol importante en la prevención de la acidosis durante el período de adaptación cuando los rumiantes son alimentados con dietas ricas en concentrados (Counotte *et al.*, 1981).

Otro grupo de bacterias a destacar son aquellas que hidrolizan los lípidos por medio de la producción de lipasas que liberan ácidos grasos (Liu *et al.*, 2009). Así, los lípidos son modificados por la fermentación microbiana, donde los ácidos grasos insaturados son transformados en ácidos grasos saturados en el rumen. Los microorganismos ruminales transforman los lípidos por dos vías metabólicas principales que son la lipólisis y la biohidrogenación (Jenkins *et al.*, 2008).

#### **1.2.1.2. Archaeas metanogénicas**

Estos organismos pertenecen al Dominio *Archaea* (Morgavi *et al.*, 2010) y al filo *Euryarchaeota*. Los órdenes que lo componen son *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcalea* y *Methanopyrales* (Joblin, 2005). Representan menos del 1% del total de la población microbiana del rumen (Wright *and* Klieve, 2011), alcanzando  $10^8$  células/g de contenido ruminal en animales con dietas a base de concentrados y  $10^{10}$  células/g de contenido ruminal en aquellos alimentados a base de pasto (Joblin, 2005). Estos representantes de la microbiota ruminal mantienen relaciones de sinergismo con las bacterias y de simbiosis con los protozoos (Wright *and* Klieve, 2011).

Son organismos estrictamente anaerobios y cuentan con cofactores y coenzimas específicas involucradas en la generación de  $\text{CH}_4$  (Woese *et al.*, 1990; Thauer *et al.*, 2008). Se distinguen de otros procariotas debido a que tienen pseudomureina y proteínas en la capa superficial de pared celular, además presentan ARN (ácido ribonucleico) polimerasas y lípidos en la estructura de las membranas, enlazados al glicerol (Thauer *et al.*, 2008; Puniya *et al.*, 2015).

Se considera que la producción de este GEI es un proceso necesario dentro del rumen, ya que es la vía por la cual se mantiene baja la concentración de  $\text{H}_2$  en el ambiente ruminal mediante la reducción del  $\text{CO}_2$  (Bodas *et al.*, 2012). Los principales sustratos para

la formación de CH<sub>4</sub> son H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> liberados en el rumen a partir de la fermentación del alimento (Van Zijderveld *et al.*, 2011). Este gas es uno de los productos finales de la fermentación ruminal (Garnsworthy *et al.*, 2012), siendo el 80% proveniente de la fermentación de la fibra, mientras que el 20% restante se genera durante la descomposición del estiércol (Vergé *et al.*, 2007). Los metanógenos desempeñan un papel fundamental sobre la captación del H<sub>2</sub> generado durante la fermentación en el rumen, debido a que lo metabolizan rápidamente (Castillo-González *et al.*, 2014). La síntesis de CH<sub>4</sub> depende principalmente del nivel de consumo, tipo de dieta, procesamiento del alimento y proporción de los ácidos acético/propiónico (A/P) (Johnson *and* Johnson, 1995).

Se han identificado 113 especies pertenecientes a 28 géneros, pero solo 12 de ellas han sido aisladas del rumen (Tajima *et al.*, 2001; Whitford *et al.*, 2001). Estas corresponden a: *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobricobium mobile*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanoculleus olentangyi*, *Methanosphaera sp.*, y *Methanomassiliicoccaceae*. De ellas, las primeras cinco especies son predominantes en el rumen, con una presencia que varía entre 30 y 90% (Cuadro 17 del Anexo) (Paynter *and* Hungate, 1968; Kumar *et al.*, 2012).

La comunidad de metanógenos presenta cierta plasticidad en cuanto a su respuesta al H<sub>2</sub> metabólico, dado que hasta el momento existen al menos cinco vías metabólicas distintas descritas (Poulsen *et al.*, 2013). La ruta principal se conoce como hidrogenotrófica, basada en la actividad de *Methanobrevibacter ruminantium* (Leahy *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2014). Esta vía parte de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> y produce CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O. Existen dos



vías alternativas, son la metilotrópica y la acetilclástica, que parten de alcohol metílico y acetato respectivamente.

### 1.2.1.3. Protozoos

Los protozoos constituyen el 40-80% de la biomasa del rumen (Firkins *et al.*, 2007; Puniya *et al.*, 2015) y son organismos unicelulares, anaerobios estrictos, con un tamaño que varía entre 15-250  $\mu\text{m}$  de largo y 20-200  $\mu\text{m}$  de ancho (Dehority, 2003). Representan una fracción pequeña ( $10^4$ - $10^6$ /mL de fluido ruminal) del número total de microorganismos en el rumen, pero si solo se toma en cuenta su masa, representan prácticamente lo mismo que las bacterias (Puniya *et al.*, 2015). Esta población se encuentra envolviendo a las partículas de los alimentos y a las bacterias, lo cual facilita su participación en la digestión de los carbohidratos, proteínas y grasas (Williams and Coleman, 2012). Su actividad fibrolítica es relevante (Kamra *et al.*, 1991), mientras que su actividad proteolítica es extremadamente baja (6 a 10 veces menor que en las bacterias) (Brock *et al.*, 1982).

Los órdenes más abundantes son *Entodiniomorphida* y *Holotricha* (Firkins *et al.*, 2007) (Cuadro 18 del Anexo). Aproximadamente el 90% del total de protozoos pertenece al orden *Entodiniomorphida*, los cuales son más complejos en cuanto a su morfología que el orden *Holotricha*. Poseen especificidad en cuanto a los requerimientos nutricionales y están involucrados en la hidrólisis y fermentación de la celulosa (Yañez-Ruiz *et al.*, 2004), hemicelulosa y pectina (Van Soest, 1994). Además, estos pueden depredar bacterias e incluso a otros protozoos, provocando un reciclado de nitrógeno (Koenig *et al.*, 2000). A partir de la fermentación de estos compuestos se obtienen AGV (acetato y butirato principalmente) e  $\text{H}_2$  (Williams and Coleman, 2012). Este último es utilizado por las *archaeas* metanogénicas que se encuentran adheridas a los protozoos

para producir CH<sub>4</sub>, pudiendo representar hasta el 45% del total de este gas producido por el rumiante (Finlay *et al.*, 1994; Hegarty, 1999).

El segundo orden en cuanto a su abundancia corresponde a *Holotricha*. Estos organismos pueden asimilar azúcares solubles y carbohidratos no estructurales disminuyendo el riesgo de acidosis del animal. Asimismo, pueden retener algunos polisacáridos como reserva en su interior confundándose con el macronúcleo celular (Van Zwieten *et al.*, 2008).

#### **1.2.1.4. Hongos**

Los hongos ruminales constituyen entre 5 y 8% del total de la biomasa del ecosistema ruminal, son anaeróbicos y pertenecen al dominio *Eukarya*. Constituyen los primeros colonizadores de los tejidos vegetales debido a su tamaño, estructuras morfológicas y actividad enzimática (Akin *et al.*, 1990). Los hongos ruminales presentan la capacidad de hidrolizar completamente los tejidos no lignificados de las plantas, mientras que los lignificados solo son parcialmente degradados (Akin *and* Benner, 1988). Hasta ahora los géneros identificados en el rumen corresponden a *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* (Kittelman *et al.*, 2012), *Anaeromyces* (Ho *et al.*, 1990) y *Cyllamyces* (Ozkose *et al.*, 2001).

### **1.3. Estrategias de mitigación de CH<sub>4</sub> ruminal**

Desde hace algunas décadas, varios grupos de investigación se han enfocado en probar diversas estrategias con el fin de mejorar la fermentación ruminal, especialmente orientados a disminuir la producción de CH<sub>4</sub>. Tales estrategias tienen como objetivos incrementar la *performance* animal, mejorarlos genéticamente o modular la fermentación ruminal a través del uso de aditivos en alimentos y raciones (Basarapet *et al.*, 2013; Cobellis *et al.*, 2016). Estas estrategias pueden agruparse de acuerdo a su modo de acción: (a) por medio de la disminución en la producción de CH<sub>4</sub> indirectamente (ej.; defaunación,

estimulación de la producción de propionato, reducción de carbohidratos estructurales o aumento de aquellos fácilmente fermentables), (b) por inhibición directa de las *archaeas* metanogénicas a través de la evaluación de productos (ej.; vacunas, uso de compuestos derivados de plantas, antibióticos ionóforos) y (c) por el aprovechamiento de vías metabólicas alternativas para el uso de H<sub>2</sub>.

Para abordar el primer objetivo en cuanto a la *performance* animal se recurre al uso de suplementos energéticos o proteicos en alimentos deficientes, con el objeto de mejorar la calidad de las pasturas por incremento de la digestibilidad (Hristov *et al.*, 2013). Esta estrategia permite reducir la producción de CH<sub>4</sub> como consecuencia del aumento en la eficiencia de la fermentación ruminal, ya que se incrementa la producción de propionato y disminuye la disponibilidad de H<sub>2</sub> para generar CH<sub>4</sub> (Lovett *et al.*, 2003). También se ha reportado que los forrajes C3 (ryegrass o trigo) producen menos CH<sub>4</sub> por unidad de materia seca digestible que los C4 (maíz y sorgo), posiblemente debido a la alta cantidad de fibra presente en estos últimos (Ulyatt *et al.*, 2002). La suplementación con grasas incrementa la densidad de energía de la dieta, lo cual también aumentaría la *performance* del animal (Grainger *et al.*, 2008; Grainger and Beauchemin, 2011) y la eficiencia del alimento (Jordan *et al.*, 2006).

En cuanto al segundo objetivo, la estrategia se enfoca a la mejora de la salud animal, la resistencia a enfermedades y la disminución de la mortalidad y la morbilidad. Todo ello podría aumentar la productividad del rebaño y reducir la intensidad de las emisiones de GEI en todos los sistemas pecuarios (Herrero *et al.*, 2011). La selección genética apunta a elegir animales de baja emisión de CH<sub>4</sub>. Se han identificado animales en pastoreo como altos y bajos emisores de CH<sub>4</sub> por unidad de alimento consumido bajo el mismo tipo de dieta (Pinares-Patiño *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2019). En estos trabajos se demostró que los volúmenes de emisiones de CH<sub>4</sub> de diferentes

animales se basan en sus diferentes microbiomas ruminales y que la propiedad es persistente y hereditaria. Con base en ello, se podría seleccionar generaciones futuras de ganado que hayan sido determinadas genéticamente (Goopy *et al.*, 2016). De este modo, rebaños con animales altamente productivos generarían incremento de la producción total, con disminución de las emisiones de CH<sub>4</sub> por producto (Patra, 2012; Haque, 2018). Con respecto al tercer objetivo, se han reportado diversos trabajos en cuanto a la modulación de la fermentación ruminal a través del uso de aditivos de alimentos o raciones. En este sentido se usan en rumiantes compuestos o antibióticos ionóforos tales como la monensina para mejorar la eficiencia de producción de carne, leche y reducir la producción de CH<sub>4</sub> de manera dosis dependiente (Van Nevel *and* Demeyer, 1996; Beauchemin *et al.*, 2008). Estos compuestos no alteran ni la cantidad ni la diversidad de las *archaeas* metanogénicas (Hook *et al.*, 2009), pero favorecen a las poblaciones bacterianas Gram (-), lo que conlleva a un aumento en la concentración de propionato. Este cambio en la fermentación disminuye la disponibilidad de H<sub>2</sub> para generar CH<sub>4</sub> y por ello se considera una estrategia de mitigación. La monensina podría utilizarse en períodos cortos de tiempo para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub>, lo cual también mejoraría la eficiencia de utilización del alimento. Sin embargo, el uso de ionóforos como aditivos en el alimento ha sido restringido en la Unión Europea (European Commission 2003; Patra, 2012), ya que se considera una posible resistencia de los microorganismos a estos compuestos y que podrían transmitirse a los humanos mediante los productos de origen animal (Durmic *and* Blache, 2012). Se ha reportado que el uso de productos a base de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) mejoran tanto la producción de leche como la ganancia de peso (Robinson, 2010). En el mercado se encuentran disponibles numerosos productos comerciales que varían ampliamente tanto en la cepa de *S. cerevisiae* utilizada, como en el número y la viabilidad de las mismas (Beauchemin *et al.*, 2003). Asimismo,

se han probado enzimas como aditivos para digerir la fibra, entre ellas celulasas y hemicelulasas. Las enzimas pueden mejorar la digestión de la fibra ruminal y la productividad de los componentes (Beauchemin *et al.*, 2003). Otra estrategia disponible es el uso de compuestos bioactivos o metabolitos secundarios, que corresponden a grandes grupos químicos que forman parte del metabolismo de los vegetales (Busquet *et al.*, 2006; Bodas *et al.*, 2012). Las plantas medicinales son el recurso biológico más rico de drogas de los sistemas tradicionales de medicina, medicinas modernas, nutracéuticos, suplementos alimenticios, medicinas populares, farmacéuticas y entidades químicas para drogas sintéticas (Ncube *et al.*, 2008). Estos compuestos bioactivos abundan en las plantas medicinales y se caracterizan por estar presentes en bajas concentraciones, variando sus niveles en el tiempo, espacio y entre especies (Wenk, 2003). Algunos de estos productos son considerados moduladores selectivos de las poblaciones microbianas del rumen y amigables con el ambiente, por lo que tendrían una mejor aceptación por los consumidores dado que son reconocidos como “seguros” para el consumo humano (Agarwal *et al.*, 2009; Patra and Yu, 2012; Pal *et al.*, 2015). Mediante el uso de estos compuestos es factible lograr una importante disminución de CH<sub>4</sub> sin alterar de manera perjudicial la fermentación ruminal (Bhatta *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). A partir de los vegetales se puede extraer una amplia gama de componentes (Hartmann, 2007) y separar diferentes fracciones (por ejemplo: hidrofílicas, lipofílicas) según el solvente o el método que se utilice (Tian *et al.*, 2009; Banik *et al.*, 2016). Resulta difícil clasificar estos compuestos debido a que sus vías metabólicas de síntesis, sus propiedades y sus mecanismos de acción a menudo se superponen (Bodas *et al.*, 2012). Los grandes grupos más conocidos son clasificados según la ruta metabólica de síntesis en: (a) terpenos o isoprenoides y esteroides, (b) alcaloides y (c) fenoles. Los *terpenos* o *isoprenoides* se clasifican según el número de unidades de terpeno. Los monoterpenos (C<sub>10</sub>) son las

moléculas más representativas, constituyendo el 90% de los aceites esenciales (AE) (Bodas *et al.*, 2012). Los diterpenos (C20) presentan una amplia gama de usos en la medicina tradicional (Mendoza *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008). Los triterpenos (C30) son importantes debido a su amplia distribución en el reino vegetal y a sus aplicaciones en farmacología (saponinas triterpénicas o glucósidos cardiotónicos) (Bakkali *et al.*, 2008). Los *esteroides* conforman un grupo importante en esta categoría, ya que estimulan el crecimiento de las plantas y son utilizados en la industria farmacológica debido a sus efectos antiinflamatorios y antimicrobianos (Grassmann, 2005). El segundo grupo, corresponde a los *alcaloides* que son compuestos que contienen nitrógeno. Muchos son extremadamente tóxicos o teratogénicos para otros organismos, pero algunos pueden tener efectos farmacológicos (Bruneton, 1999). Los *fenoles* constituyen el tercer grupo y son una familia ampliamente distribuida en la naturaleza. Se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos oxidrilo y se pueden encontrar desde moléculas fenólicas simples, hasta compuestos altamente polimerizados. Contribuyen en la pigmentación, en el crecimiento y en la reproducción de las plantas, así como también proporcionan resistencia a patógenos y depredadores (Bravo, 1998). Se encuentran comúnmente en las plantas superiores debido a que están involucrados en la síntesis de ligninas (Bravo, 1998; Medjekal *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que tienen una marcada actividad antimicrobiana (Dorman *and* Deans, 2000).

Sobre la base de las estrategias disponibles, en América Latina se han realizado diferentes ensayos *in vitro* empleando una variedad de suplementos dietarios para analizar el potencial de reducción de CH<sub>4</sub>. En este sentido, el uso de AE de *Lippia turbinata* G. (LT) y *Tagetes minuta* L. (TM) mostró buenos resultados en la reducción de CH<sub>4</sub> entérico (García, 2018; García *et al.*, 2018; 2020). El uso de AE de *Lippia origanoides* Kunth modula la estructura de la comunidad de los metanógenos ruminales, la actividad

fibrolítica y, consecuentemente, la metanogénesis ruminal (Rodríguez, 2014). También se han probado variedades de *Morus alba*, pero no se lograron resultados positivos posiblemente debido a la dosis utilizada (González *et al.*, 2010). Asimismo, otros estudios destacan el potencial de los propóleos para modelar la fermentación ruminal con el fin de reducir la producción de CH<sub>4</sub> (Selem, 2012; Montiel *et al.*, 2018). Los resultados reportados son diversos y se requiere de la ejecución de ensayos a nivel *in vivo* para verificar el potencial de reducción de CH<sub>4</sub> de los suplementos dietarios.

Por todo lo expuesto, resulta importante concentrar esfuerzos en desarrollar estrategias de mitigación que abarquen un enfoque con perspectivas más sistemáticas, garantizando beneficios tanto a nivel productivo, social y ambiental (Benaouda *et al.*, 2017). En este abordaje, es necesario comprender las funciones y composiciones de las comunidades microbianas del rumen para mejorar la productividad animal y reducir la cantidad de energía perdida como CH<sub>4</sub> (Henderson *et al.*, 2015). Las alternativas de mitigación pueden diferir por su factibilidad, costo y posibilidad de aplicación por los usuarios finales. Está claro que es poco probable que los agricultores adopten estas medidas a menos que haya un impacto económico positivo en la producción animal (Beauchemin *et al.*, 2008).

### **1.3.1. Aproximaciones *in vitro* para el estudio de la dinámica de la fermentación**

Los sistemas *in vitro* han sido diseñados con el objetivo de testear un gran número de compuestos en un tiempo corto, de manera simple, selectiva, fácilmente interpretable y de bajo costo (Borris, 1996). Este tipo de aproximaciones simulan una simplificación de los complejos procesos que suceden en el rumen (Merry *et al.*, 1990). El funcionamiento consiste en la incubación de uno o varios sustratos o moduladores de la microbiota en condiciones que representan el ambiente ruminal, donde el gas producido se toma como un indicador indirecto de la cinética de fermentación (Schofield *et al.*,

1994; Rymer *et al.*, 2005). Si además se mide la degradación de los sustratos incubados, la información obtenida representa la proporción de lo que se ha fermentado y ha sido utilizado para el crecimiento bacteriano. Las mediciones que se obtienen complementan los análisis de laboratorio estándar y por lo tanto ofrecen una alternativa más rápida y barata para la determinación de la digestibilidad de los nutrientes *in vivo*. Además, se pueden definir factores específicos que en estas condiciones pueden ocultarse por una gran complejidad de situaciones (Kajikawa *et al.*, 2003) y se pueden predecir las respuestas con gran precisión (Jayanegara *et al.*, 2013). Los resultados de este tipo de ensayos están sujetos a limitaciones tales como pequeña replicación experimental, posibles falsos negativos y positivos, etc (Newbold *et al.*, 2004). Además, se requiere un largo tiempo para realizar un análisis y una gran cantidad de pasos, ya que la muestra no tiene flujo de recambio (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

En resumen, los sistemas de producción de gas *in vitro* presentan las siguientes ventajas: (a) la producción de gas que se mide es resultado directo del metabolismo microbiano; (b) los productos finales de la fermentación pueden ser monitoreados en intervalos cortos de tiempo; (c) permite probar varios compuestos a la vez (sustancias químicas, especies vegetales, ingredientes de dietas, extractos, etc) y las combinaciones entre ellos; (d) permite disminuir el uso de animales experimentales (Busquet *et al.*, 2006; Patra and Yu, 2012; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016).

Los modelos fueron evolucionando desde la medición manual de la presión de gas (Theodorou *et al.*, 1994), la recolección del mismo (Tekippe *et al.*, 2013) y el uso de equipos automatizados que permitían la medición de la acumulación de gas en tiempo real (Groot *et al.*, 1996; Pell and Schoefield, 1993), hasta la liberación y recolección periódica de gases a través de una válvula solenoide (Davies *et al.*, 2000) así como equipos inalámbricos para la liberación de presión de gas (Ankom Technology, Macedon,



NY, Estados Unidos). Todos estos avances aún requieren de la colecta manual del gas para su posterior análisis. Para subsanar este problema, existe una técnica de medición automatizada que se basa en sensores de presión para analizar la proporción de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> por cromatografía gaseosa (Muetzel *et al.*, 2014). De este modo, la determinación de los productos finales de la fermentación, los residuos y los perfiles de producción de gas permiten calcular y estimar tanto la tasa como la eficiencia de fermentación.

El microbioma ruminal es diverso y posee un ambiente competitivo, el cual se encuentra en un estado constante de flujo. No obstante, la posibilidad de mejorar las funciones del rumen existe y los intentos por alterar la fermentación ruminal usando compuestos bioactivos se realizan desde hace muchos años. Las motivaciones para enfocarse en la manipulación ruminal se centran en el deseo de obtener cambios positivos en la fermentación y subsecuentemente la productividad del animal, sin que ocurran desórdenes digestivos (McCann *et al.*, 2017). Como se mencionó con anterioridad, las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos, los cuales pueden dar respuesta de defensa al ataque de insectos y microorganismos, así como la adaptación a ambientes adversos (Akula *and* Ravishankar, 2011). Por lo cual, se entiende por bioactivo a aquellos compuestos que tienen la capacidad de provocar efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos o animales (Durmic *and* Blache, 2012). Se ha demostrado que estos compuestos son útiles para manipular algunos procesos metabólicos en los rumiantes y modular selectivamente las poblaciones microbianas del rumen permitiendo mejorar la fermentación, el metabolismo del nitrógeno y reducir la producción de metano (Patra *and* Saxena, 2011; Garcia *et al.*, 2020).

Con base en lo anteriormente expuesto, la pregunta de investigación a responder en esta Tesis fue determinar si compuestos bioactivos provenientes de plantas que crecen

en Argentina eran capaces de modular el ecosistema ruminal para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub> entérico evaluado en ensayos *in vitro*.

## **CAPÍTULO 2**

## **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MATERIAL VEGETAL Y SUS EXTRACTOS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL**

### **2.1. Introducción**

Argentina cuenta con una amplia diversidad de especies botánicas que contienen compuestos bioactivos que han sido utilizados tradicionalmente con fines medicinales. El 42% de la flora medicinal a nivel nacional está compuesta por las familias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Verbenaceae* y *Solanaceae* (Goleniowski *et al.*, 2006). Se conocen mezclas de compuestos bioactivos de 602 especies de plantas que poseen propiedades terapéuticas (Ratera *and* Ratera, 1980; Alonso, 2004) y acción antimicrobiana (Salvat *et al.*, 2004; Cabana *et al.*, 2013, da Cruz Cabral *et al.*, 2013). Muchas de ellas contienen compuestos con capacidad antioxidante, particularmente del tipo polifenoles que pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, inhibidores de oxígeno y quelantes de metales (Morel *et al.*, 1998; Wagner *and* Ulrich-Merzenich, 2009).

El poleo, cuyo nombre científico es *Lippia turbinata f. turbinata* G. (LT), pertenece a la familia *Verbenaceae*, que abarca cerca de 100 géneros y 2000 especies aproximadamente. Argentina cuenta con 26 géneros y 180 especies, de las cuales 55 son endémicas (Múlgura *et al.*, 2003). En medicina popular LT es utilizado como diurético y digestivo. Sobre la base de sus propiedades aromáticas y medicinales, es una planta requerida en la industria para la elaboración de yerbas compuestas y té de hierbas. Su distribución en Argentina abarca las provincias del centro-oeste (Alonso, 1998).

El suico, cuyo nombre científico es *Tagetes minuta* L. (TM), pertenece a la familia *Asteraceae*, la cual comprende alrededor unos 1700 géneros (Katinas *et al.*, 2007) con unas 23.000 especies (Jeffrey, 2007; Sadia *et al.*, 2013). Cabe destacar que a pesar de que se distribuye por todo el mundo (Gil *et al.*, 2000), más de 50 de ellas son originarias de América Central y América del Sur (Kaplan, 1958; McVaugh, 1984). En Argentina

se pueden encontrar 12 especies, 5 de las cuales son endémicas (Ojeda *et al.*, 2015). *Tagetes minuta* es una de las tres especies que se encuentran en la provincia de Córdoba y crece en forma silvestre desde la primavera hasta principios del invierno cuando completa su ciclo de vida en zonas montañosas. Ha sido ampliamente utilizado como antihelmíntico, diurético, antiespasmódico y como infusión para el tratamiento de enfermedades intestinales y estomacales (Tereschuk *et al.*, 1997; El-Deeb *et al.*, 2004). Además, se ha encontrado que posee bioactividad contra bacterias tanto Gram (+) como Gram (-) (Tereschuk *et al.*, 1997; Ojeda *et al.*, 2015). También se usa en la industria alimenticia, dado que se incorpora como componente de bebidas, postres, dulces y gelatinas, entre otros usos (Leung, 1980).

En la actualidad se cuenta con información de muchas especies con propiedades antimicrobianas utilizadas como modificadores de la fermentación ruminal (Busquet *et al.*, 2006; Patra *et al.*, 2010). Nuestro grupo de trabajo ha avanzado en esta línea, haciendo énfasis en el uso de los AE extraídos de LT, TM y otras especies que crecen en las Sierras de Córdoba como aditivos que permitan mitigar la emisión de CH<sub>4</sub> (Martínez Ferrer *et al.*, 2014; García *et al.*, 2018; 2020). Con el objeto de ampliar y complementar el enfoque de la línea de trabajo, en este capítulo se aborda el estudio de otros compuestos, diferentes a los AE, presentes tanto en el LT como en el TM y con bioactividad potencial para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub>. Existen pocos trabajos donde se aborda el tema de extractos o compuestos bioactivos que sean diferentes a AE, saponinas, taninos y extractos líquidos, generando un vacío de conocimiento. El estudio de exploración de las fracciones sólidas secuenciales obtenidas luego del uso de solventes con polaridades variadas, resulta más ventajoso para separar compuestos de polaridad afín y práctico para su dosificación en las dietas de los animales. Al ser los compuestos bioactivos una mezcla de varios elementos, separarlos por polaridades brinda mayor información respecto a la

bioactividad ya que, al haber diferentes grupos estructurales y sustituyentes, resulta en componentes de polaridad diversa.

Las técnicas de producción de gas *in vitro* son ampliamente utilizadas para evaluar de manera rápida y sencilla la capacidad antimetanogénica y modificadora de la fermentación ruminal de una amplia gama de plantas y compuestos (García-González *et al.*, 2008a; Patra *et al.*, 2010; Durmic *et al.*, 2010). Estas características son ideales para diseñar pruebas donde se busque obtener una gran cantidad de información en poco tiempo y sin necesidad de contar con demasiados animales experimentales.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue examinar *in vitro* la presencia y nivel de bioactividad en planta entera o fracciones de *L. turbinata* G. y *T. minuta* L. obtenidas a partir del tratamiento con diferentes solventes.

## **2.2. Hipótesis**

Tanto los materiales vegetales completos como los extractos sólidos de LT y TM obtenidos a partir de solventes poseen actividad antimicrobiana que modula el ecosistema ruminal, especialmente en lo que hace a la producción de metano.

## **2.3. Materiales y métodos**

### **2.3.1. Material vegetal**

Las muestras vegetales pertenecen a las especies LT y TM. Las mismas fueron recolectadas en Characato (31°28'77''S, 64°12'32''W), provincia de Córdoba (Argentina) entre abril y mayo de 2016. Posteriormente a su recolección, un representante de cada espécimen se depositó en la Colección de Servicios de Herbario "ACOR" de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba para su identificación taxonómica (Cabrera, 2012; Múlgura *et al.*, 2012). El material restante fue almacenado en un lugar fresco y oscuro hasta la siguiente etapa.

### 2.3.2. Obtención de los extractos vegetales

El material vegetal (hojas y flores) fue oreado y molido en molinillo de cuchillas (Tipo Wiley Model 4, Thomas Scientific™, Estados Unidos) para ambas especies (poleo molido, PM; suico molido, TM). Se determinó materia seca en estufa a 105 °C. Se realizaron extracciones consecutivas (secuenciales) según la polaridad de los solventes empleados por Tian *et al.* (2009) con las siguientes modificaciones. Se colocaron 9 g (en base seca) de cada especie en balones a los cuales se le agregaron 250 mL de éter de petróleo y se dispusieron en batería calefactora con circuito cerrado (Decalab Fbr<sup>R</sup>, Argentina) a una temperatura de 60 °C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, el contenido del balón se filtró mediante papel de filtro tipo Whatman N ° 1, descartándose el solvente. El residuo sólido permaneció toda la noche bajo campana de extracción de gases y protegido de la luz. Una vez seco el residuo, se guardó una fracción de cada especie vegetal en botella de propileno dentro de desecador y al resguardo de la luz. Esta fracción correspondió al residuo en éter (poleo en éter, PE; suico en éter, SE). La fracción restante se utilizó para la posterior extracción con acetona. El procedimiento se realizó según lo descrito anteriormente, excepto que la temperatura de ebullición fue de 56,5 °C. Así se obtuvo el residuo seco (poleo en acetona, PA; suico en acetona, SA) que fue guardado en botella de propileno dentro de desecador al resguardo de la luz. Una parte de este residuo seco se utilizó para la extracción con alcohol etílico a 78 °C durante 6 h. El residuo seco obtenido se guardó de igual manera que los anteriores (poleo en alcohol, PAL; suico en alcohol, SAL).

Para obtener el extracto acuoso se utilizaron 50 g de material vegetal en base seca en 250 mL de agua destilada en un vaso de precipitado. Los mismos se calentaron en llama baja por 5 a 10 min sobre mechero (Patra *et al.*, 2010), se dejaron enfriar y se filtraron de igual manera que los demás residuos. El material obtenido posterior al filtrado

fue liofilizado (Freezone 12 Plus, LABCONCO, Kansas, Estados Unidos) y se guardó en botella de propileno dentro de un desecador, al resguardo de la luz hasta su uso (poleo en agua, PAG; suico en agua, SAG).

La elección de los solventes fue realizada en función de la ausencia de toxicidad para el ambiente ruminal en bajas dosis y teniendo en cuenta la diferencia que presentan en cuanto a polaridad (Tian *et al.*, 2009; Patra *et al.*, 2010; Banik *et al.*, 2016). De este modo se generaron las diferentes fracciones que corresponden a los siguientes tratamientos: (a) hojas molidas de ambas especies (PM y SM), (b) extractos en éter (PE y SE), (c) extractos en acetona (PA y SA), (d) extractos en alcohol (PAL y SAL) y (e) extractos en agua (PAG y SAG) en tres dosis (0, 1 y 2 g/L), donde la dosis 0 se usó como control (D0). Por lo tanto, se evaluaron 21 tratamientos en total (control + 2 especies x 4 extractos + material vegetal x 2 dosis).

### **2.3.3. Incubación *in vitro***

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Calidad de Forrajes y Nutrición Animal, de la Estación Experimental Manfredi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA), en la provincia de Córdoba.

Los efectos de las plantas molidas y sus extractos o fracciones sobre la fermentación ruminal fueron examinados en incubaciones de cultivos *in vitro* en botellas de 120 mL. El sustrato que se utilizó para la fermentación fue una mezcla de heno de alfalfa (0,4 g) y grano de maíz húmedo (0,1 g) completamente homogeneizado y molido a través de un tamiz de 2 mm. La composición química del sustrato se muestra en el Cuadro 19 del Anexo.

Para obtener el fluido ruminal (FR) utilizado en las incubaciones se usaron tres novillos Hereford con cánula ruminal ( $516 \pm 53$  kg). Los mismos fueron alimentados con una dieta de heno de alfalfa y grano de maíz molido en una proporción 80:20 en base seca



(Cuadro 20, Anexo), 10 días previos al inicio del ensayo (período de adaptación) y durante el mismo. Los animales tuvieron acceso al agua *ad libitum*. El FR se recolectó antes del alimento de la mañana (hora 0) y se transportó hasta el laboratorio en recipientes térmicos precalentados. Una vez allí, el FR fue homogeneizado y filtrado dos veces a través de una doble capa de gasa en un matraz con agitador magnético mantenido a 39°C.

El medio de cultivo consistió en 40 mL de una solución *buffer* carbonato-fosfato y 10 mL de FR mantenido bajo flujo continuo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 39 °C (Tilley *and* Terry, 1963). Para obtener los tratamientos correspondientes a la dosis de 1 g/L, se incorporaron 50 mg de extracto en 450 mg de sustrato, excepto en el control donde el mismo alcanzó 500 mg. En el caso de la dosis de 2 g/L, la cantidad de extracto incorporado fue de 100 mg, mientras que de sustrato se agregaron 400 mg. A todas las botellas se les adicionaron 50 mL del medio de cultivo manteniendo las condiciones de anaerobiosis. Estos recipientes se sellaron con tapones de gomas y precintos de aluminio para su posterior inmersión en una incubadora, donde se mantuvieron a 39 °C por 48 h. Además, se incluyó un blanco (FR más *buffer*, sin sustrato) usado para corrección de los datos de producción de gas.

La presión en las botellas se midió a intervalos predeterminados (horarios) durante la incubación con un transductor de presión (Sper Scientific Ltd., Scottsdale, Arizona, Estados Unidos). Las botellas se agitaron manualmente luego de cada lectura según lo sugerido por Theodorou *et al.* (1994). El gas fue recolectado en botellas de 250 mL para la posterior determinación de CH<sub>4</sub>. Al final de la incubación (48 h) las botellas se colocaron en hielo con el fin de detener la fermentación y se almacenaron a -20 °C para análisis posteriores.

### 2.3.4. Análisis químico del material vegetal, de los extractos, variables y parámetros bioquímicos de fermentación

El análisis químico del material vegetal y extractos obtenidos se basó en las siguientes determinaciones: materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas (Cen), proteína bruta (PB), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), digestibilidad de la materia seca *in vitro* (DMS<sub>iv</sub>) (Cuadro 1). La estimación de la MS se realizó en estufa a 105 °C por 24 h, mientras que la de Cen se realizó en una mufla a 550 °C por 6 h. La MO se obtuvo mediante la diferencia de pesajes entre la MS y la Cen. La PB fue determinada por el método Kjeldahl (AOAC, 1990: 984.13). Las fibras, tanto FDN como FDA, se analizaron según lo propuesto por Van Soest *et al.* (1991) usando un Analizador de Fibra ANKOM<sup>200</sup> (Ankom<sup>®</sup>, Tech. Co., Macedon, NY, Estados Unidos), con amilasa y sin sulfito de sodio. La determinación de DMS<sub>iv</sub> se efectuó de acuerdo con la metodología de Tilley *and* Terry (1963) usando un incubador Daisy<sup>II</sup> (Ankom<sup>®</sup>, Tech. Co., Macedon, NY, Estados Unidos) con una relación 1:4 FR: *buffer* fosfato-carbonato.

Las variables de fermentación estudiadas fueron la producción de gas, la concentración de CH<sub>4</sub> y la degradabilidad *in vitro* de la MS y MO. El volumen total de gas producido luego de 48 h de incubación se calculó mediante una ecuación de regresión lineal ajustada en ensayos previos realizados por el grupo de trabajo (García, 2018):

$$\text{Volumen}_{(\text{presión})} = 4,905 \times \text{psi} + 0,543 \quad (n = 629; r^2 = 0,972);$$

La producción de gas fue estimada a partir del registro de la presión a las 4, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 h de incubación utilizando un transductor de presión (Sper Scientific Ltd., Scottsdale, Arizona, Estados Unidos) y se calculó sumando el volumen de gas corregido por la ecuación de regresión y por el blanco (botellas sin sustrato). Además, se determinó la producción de gas respecto a los g de MS incubada (PGMS; mL/gMSi) y por los g de MO incubada (PGMO; mL/gMOi).

Para la medición de CH<sub>4</sub> producido se recolectó el volumen total de gas producido hasta las 48 h en botellas de 250 mL selladas herméticamente. La concentración de CH<sub>4</sub> *in vitro* se estimó a partir de una alícuota tomada del gas recolectado, la cual fue depositada en una botella de muestreo de gases (Exetainer® 12 mL Vial Flat Bottom, LABCO Limited, United Kindom). La cuantificación de CH<sub>4</sub> (% CH<sub>4</sub>) se realizó mediante el uso de un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard® 4890) equipado con una columna Porapak N 80/100 de 2 m de largo y N<sub>2</sub> como gas *carrier*. La temperatura del inyector fue de 110 °C, la columna se mantuvo constante a 90 °C durante el análisis y la temperatura del detector (FID) fue de 250 °C. Asimismo, la expresión del volumen de CH<sub>4</sub> producido se realizó tanto con base en la materia seca (MMSi; mL CH<sub>4</sub>/g MSi) y a la materia orgánica incubada (MMOi; mL CH<sub>4</sub>/g MOi).

La degradabilidad *in vitro* de la MS (MS d) y la MO (MO d) se determinó en forma gravimétrica por diferencia de peso y se expresó en término de gramo degradado sobre gramo incubado (degr/inc) y en porcentaje (%DMS, %DMO). El contenido de los viales se trasvasó a crisoles previamente pesados (DURAN® 25-851-32 DURAN Produktions GmbH & Co.; Hattenbergstr, Mainz, Alemania) se filtró y dejó en estufa de 105 °C por 24 h. Los residuos secos se pesaron y las cenizas se determinaron a 550 °C por 6 h.

En el caso de los parámetros bioquímicos de fermentación, a las 48 h se determinaron el pH, el contenido de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), concentración de AGV, la cantidad de protozoos y el factor de partición (FP). Los valores de pH fueron determinados en la fase líquida de los viales y se midieron con peachímetro (Sartorius PT-10, Sartorius AG, Goettingen, Alemania).

El N-NH<sub>3</sub> fue determinado mediante el uso de la técnica de espectro colorimetría empleando el kit de uremia (Lab Wiener®, Rosario, Argentina). Las muestras fueron

estabilizadas con ácido sulfúrico 0,02 N en iguales proporciones, luego fueron centrifugadas por 10 minutos a  $5,000 \times g$ . Las lecturas fueron determinadas a 540 nm con un espectrofotómetro Spectronic Helios 6 UV-Visible (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, Estados Unidos).

Las muestras para el análisis de AGV se estabilizaron con ácido ortofosfórico (1:10). Luego de ser descongeladas y centrifugadas a 16,000 g durante 10 min, se filtró el sobrenadante a través de filtros de celulosa de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  en viales de cromatografía gaseosa (GC) de 2 mL. Se inyectó una muestra de AGV de 1  $\mu\text{L}$  en un GC Perkin Elmer Clarus 580 equipado con una columna capilar Elite-FFAP (Perkin Elmer, Shelton, CT, Estados Unidos) y un detector de ionización de llama. El helio a 1,5 mL fue el gas portador. La temperatura inicial fue de 90 °C con una rampa de 12 °C / min hasta 150 °C, que se mantuvo durante 5 min.

Los recuentos de protozoos en el rumen se basaron en la metodología de Dehority (1993) que consiste en mezclar una muestra líquida previamente filtrada en alícuotas de 4 mL con 4 mL de solución salina de formalina (formalina al 10% en solución de NaCl al 0,85%). Posteriormente los preparados fueron coloreados con verde de metilo y se contaron bajo un microscopio óptico con un objetivo de 25 x (Nikon eclipse E200MV®, Nikon®, Tokio, Japón).

El FP (mg de MS degradados/mL de gas producido) fue calculado como un indicador de eficiencia de fermentación (Blümmel *et al.*, 1997).

### **2.3.5. Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 3 réplicas biológicas discontinuas en el tiempo (corridas) y en cada una de ellas 3 réplicas técnicas (botellas). El análisis se realizó por separado para cada especie vegetal (LT y TM). Los efectos fijos fueron los materiales molidos y los extractos evaluados a dos dosis de inclusión, mientras

que cada réplica biológica o corrida fue considerada como efecto aleatorio. Los datos se analizaron con modelos lineales generalizados mixtos utilizando el software R 3.6.2. El efecto de cada inclusión (extracto y material vegetal) sobre los parámetros de fermentación (diferencia de cada tratamiento con respecto al control), fue expresado como incremento o disminución (en porcentaje) respecto al valor del control (García-González *et al.*, 2008a). Se utilizó el *test* de *Dunnnett* para comparar las medias contra el control (García-González *et al.*, 2008a). La significancia se declaró cuando  $p \leq 0,05$  y las tendencias fueron discutidas cuando  $p \leq 0,10$ .

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij},$$

$Y_{ij}$  fue la observación,  $\mu$  fue la media general para cada parámetro,  $\tau_i$  fue el efecto del tratamiento ( $i = 1, \dots, 11$ ),  $\beta_j$  fue el efecto de la corrida ( $j = 1, 2, 3$ ) y  $\varepsilon_{ij}$  fue el error residual.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) entre la composición química y las variables de fermentación mediante el programa Infostat P (Di Rienzo *et al.*, 2018). Cabe aclarar que para la determinación de la degradabilidad *in vitro* del sustrato se utilizó una de las tres réplicas técnicas. La segunda se empleó para las restantes determinaciones, mientras que la tercera fue guardada como respaldo en cada una de las corridas realizadas.

## **2.4. Resultados**

### **2.4.1. Composición química del material vegetal y sus extractos**

La composición química del material vegetal y extractos obtenidos con los diferentes solventes se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1:** Composición química del material vegetal y los extractos (en g/kg MS).

	MS	MO	Cen	PB	FDN	FDA	DMS <sub>iv</sub>
<b>PM</b>	880	863	137	173	526	355	589
<b>PE</b>	905	858	142	169	526	355	600
<b>PA</b>	891	850	150	169	554	376	587
<b>PAL</b>	877	851	149	179	566	377	589
<b>PAG</b>	991	867	133	158	559	382	592
<b>SM</b>	909	915	85	145	490	340	669
<b>SE</b>	905	935	64	145	492	345	645
<b>SA</b>	897	932	68	143	559	397	599
<b>SAL</b>	882	918	82	152	578	394	564
<b>SAG</b>	986	966	34	120	606	418	568

PM: poleo molido; PE: poleo en éter; PA: poleo en acetona; PAL: poleo en alcohol; PAG: poleo en agua; SM: suico molido; SE: suico en éter; SA: suico en acetona; SAL: suico en alcohol; SAG: suico en agua; MS: materia seca; MO: materia orgánica; Cen: cenizas; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra Detergente Neutro; FDA: Fibra Detergente Ácido; DMS<sub>iv</sub>: digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

#### 2.4.2. Producción de gas, concentración de metano y degradabilidad *in vitro* del sustrato

Los efectos de la inclusión tanto de las plantas molidas como de los extractos sobre la producción de gas total, de metano y de la degradabilidad *in vitro* se presentan en los Cuadros 2 y 3.

En cuanto a LT, la producción de gas relacionada tanto a la MS incubada (mL/gMS<sub>i</sub>) y la MO incubada (mL/gMO<sub>i</sub>) se vio disminuida por los tratamientos con respecto al D0, exceptuando a PA1 y PAG1. La reducción de PGMS varió entre 3,4% y 15,1% (PA1, p=0,27 y PAG2, p<0,001). De igual modo, la PGMO disminuyó, registrándose la mínima reducción para el tratamiento PA1 (2,9%, p=0,47) y la mayor para PM2 (10,2%, p<0,0001). En cuanto a %CH<sub>4</sub>, solo PA2 (p=0,01) y PAL1 (p=0,006)

evidenciaron reducciones, las cuales variaron entre 17,5 y 23,1%, respectivamente. Respecto a la producción de mL de CH<sub>4</sub> en función de los gramos de MS y la MO incubados, los tratamientos antes mencionados mostraron reducciones significativas y variaron entre 25% (PA2: p=0,01) y 27,3% (PAL1: p=0,006) para la MSi, y 25,7% (PA2: p=0,013) y 27,9% (PAL1: p=0,007) para la MOi. Por otro lado, todos los tratamientos disminuyeron la degradabilidad de MSi y la MOi con respecto a la D0 (desde 4,2% en PAL1 hasta 12,7% en PAL2 y PAG2), exceptuando los tratamientos PA1 y PAL1 cuyas reducciones no fueron significativas.

**Cuadro 2:** Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad *in vitro* del sustrato en relación a la D0.

Variables	D0	PM1	PM2	PE1	PE2	PA1	PA2	PAL1	PAL2	PAG1	PAG2	EE	<i>p</i> -valor ANAVA
<b>PGMS (mL/gMSi)</b>	186,10	177,62*	165,73***	175,18**	168,23***	179,69	168,09***	176,62*	165,67***	179,54	158,04***	2,929	<0,0001
<b>PGMO (mL/gMOi)</b>	206,48	197,81*	185,32***	195,29*	188,44*	200,48	188,52*	197,09*	185,90*	199,89	188,61*	2,312	<0,0001
<b>%CH<sub>4</sub></b>	3,76	3,79	3,50	3,49	3,57	3,57	3,10*	2,89**	3,55	3,50	4,02	0,307	0,0194
<b>MMSi (CH<sub>4</sub> mL/gMSi)</b>	7,02	6,74	5,79*	6,12	5,91	6,43	5,23**	5,10**	5,82	6,26	5,99	0,448	0,0099
<b>MMOi (CH<sub>4</sub> mL/gMOi)</b>	7,89	7,47	6,45	6,80	6,64	7,14	5,86*	5,69**	6,56	6,92	6,71	0,501	0,0219
<b>MS d (g degr/g inc)</b>	0,76	0,71*	0,68***	0,69***	0,70***	0,72	0,69***	0,73	0,69***	0,70**	0,66***	0,015	<0,0001
<b>MO d (g degr/g inc)</b>	0,71	0,66*	0,63***	0,66*	0,65**	0,67	0,64***	0,68	0,62***	0,65**	0,62***	0,016	<0,0001

D0: dosis cero; PM1: poleo molido 1 g/L; PM2: poleo molido 2 g/L; PE1: poleo en éter 1 g/L; PE2: poleo en éter 2 g/L; PA1: poleo en acetona 1 g/L; PA2: poleo en acetona 2 g/L; PAL1: poleo en alcohol 1 g/L; PAL2: poleo molido 2 g/L; PAG1: poleo en agua 1 g/L; PAG2: poleo en agua 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento con respecto a D0.

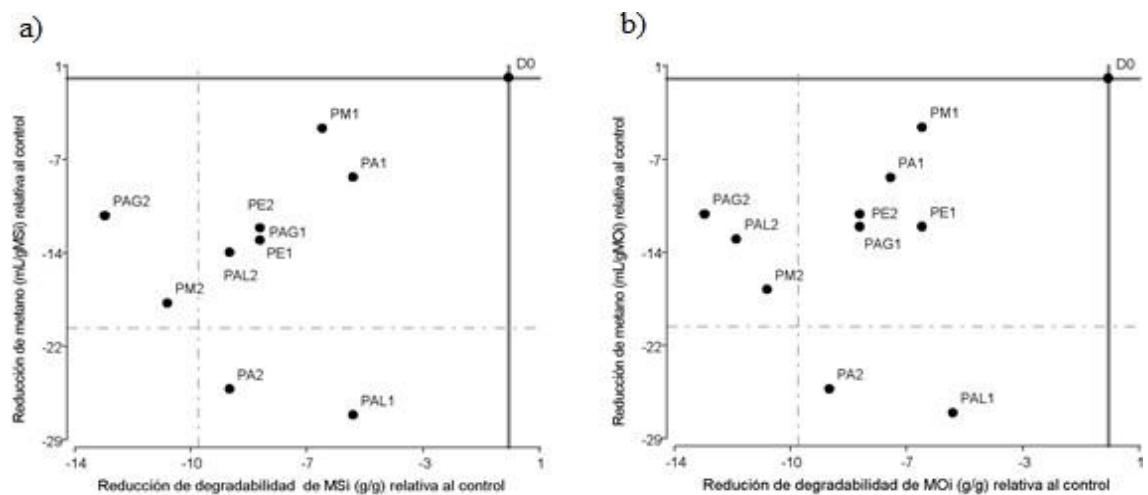


**Cuadro 3:** Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad *in vitro* del sustrato en relación a la D0.

Variables	D0	SM1	SM2	SE1	SE2	SA1	SA2	SAL1	SAL2	SAG1	SAG2	EE	p-valor ANAVA
PGMS (mL/gMSi)	186,10	179,71*	172,52***	181,00	174,12***	183,33	173,40***	179,19**	172,41***	178,29**	171,32***	1,983	<0,0001
PGMO (mL/gMOi)	206,48	198,90*	190,69***	200,21	191,61***	191,02***	202,71	198,41*	190,54***	196,41*	187,43***	2,431	<0,0001
%CH <sub>4</sub>	3,76	3,48*	3,67	3,43*	3,55	3,52	3,38*	3,60	3,68	3,63	3,46*	0,195	<0,0001
MMSi (CH <sub>4</sub> mL/gMSi)	7,02	6,24*	5,91*	5,55*	6,18*	6,47	6,38*	6,45	6,46	6,48	5,95*	0,735	<0,0001
MMOi (CH <sub>4</sub> mL/gMOi)	7,89	6,91	6,54	6,12*	6,81	7,24	6,48*	7,15	7,23	7,14	6,51*	0,756	<0,0001
MS d (g degr/g inc)	0,76	0,75	0,71*	0,71**	0,70***	0,73	0,70***	0,72	0,71*	0,70**	0,69***	0,010	<0,0001
MO d (g degr/g inc)	0,71	0,69	0,66***	0,66**	0,65***	0,67*	0,64***	0,67**	0,65***	0,65***	0,62***	0,015	0,0019

D0: dosis cero; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; SA1: suico en acetona 1 g/L; SA2: suico en acetona 2 g/L; SAL1: suico en alcohol 1 g/L; SAL2: suico en alcohol 2 g/L; SAG1: suico en agua 1 g/L; SAG2: pole en agua 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a D0.

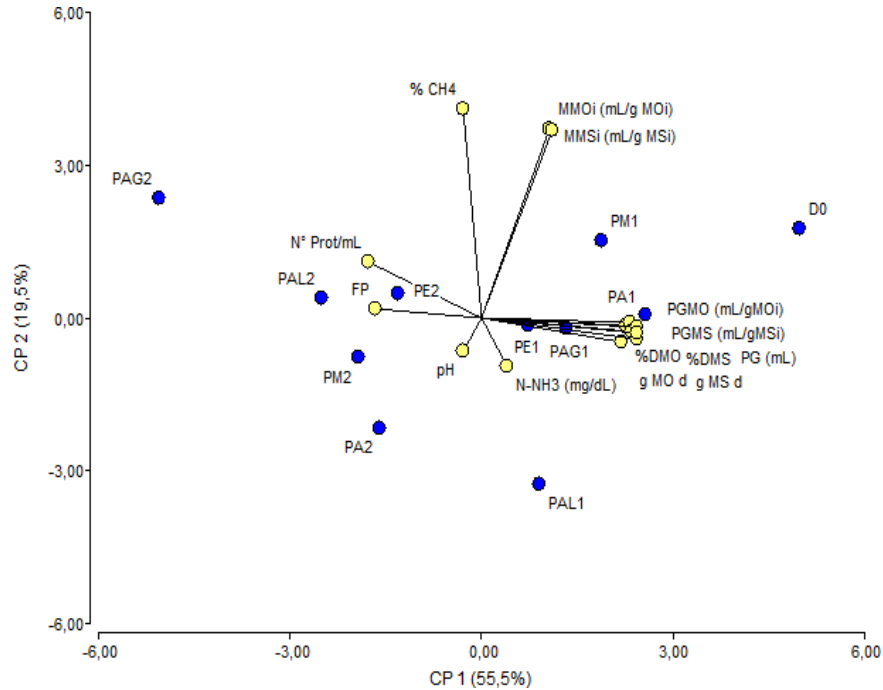
De manera gráfica, se puede observar el efecto relativo de la degradabilidad del sustrato (tanto en MS como en MO) de los tratamientos en relación con la producción de metano (Figura 4). Se evidencia que para los tratamientos PA2 y PAL1, la reducción en la cantidad de metano es mayor al 20% con respecto a la D0 (Fig.4-a y b), mientras que la degradabilidad del sustrato se vio reducida en un máximo de 12,7 % (PAL2 y PAG2) y un mínimo de 4,2% (PAL1) respecto a la D0.



**Figura 4:** a) Reducción relativa respecto al control de la producción de metano (mL/gMSi) y la degradabilidad de la MSi del sustrato (g/g). b) Reducción relativa respecto al control de la producción de metano (mL/gMOi) y la degradabilidad de la MOi del sustrato (g/g). Puntos (•): D0: dosis cero; PM1: poyo molido 1 g/L; PM2: poyo molido 2 g/L; PE1: poyo en éter 1 g/L; PE2: poyo en éter 2 g/L; PA1: poyo en acetona 1 g/L; PA2: poyo en acetona 2 g/L; PAL1: poyo en alcohol 1g/L; PAL2: poyo molido 2 g/L; PAG1: poyo en agua 1g/L; PAG2: poyo en agua 2 g/L.

El análisis de componentes principales (ACP) se realizó a partir de los datos estandarizados correspondientes a los tratamientos de LT, donde las dos primeras componentes principales explicaron el 75% de la variabilidad total observada (Figura 5). La CP1 explicó la mayor variabilidad (55,5%) y mostró que las variables con mayor inercia fueron la producción de gas y la degradabilidad (%DMS, %DMO), así como el número de protozoos/mL. Dichas variables separaron a todos los tratamientos de LT en la dosis 1, que presentaron mayores valores de producción de gas, %DMS, %DMO y menor número de protozoos/mL, con respecto a los mismos tratamientos en la dosis 2.

Para la CP2 (19,5%), las variables con mayor peso correspondieron a la producción de CH<sub>4</sub>, separando principalmente al tratamiento PAG2 de los PA2 y PAL1, que se comportaron como los más extremos.

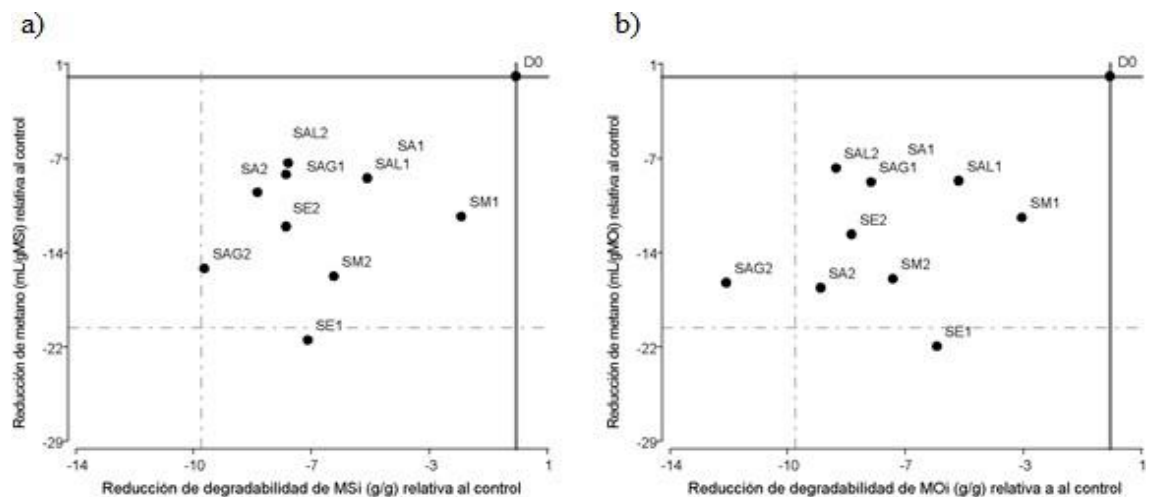


**Figura 5:** Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para LT. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2.

El patrón reportado para LT también se registró en el caso de TM, ya que la PGMS fue afectada de manera negativa, excepto por los tratamientos SE1 y SA1 ( $p=0,08$  y  $p=0,75$ , respectivamente) y varió entre 1,5% y 8% con los tratamientos SA1 y SAG2. De igual manera, la PGMO no resultó afectada por SE1 ( $p=0,28$ ) y SA2 ( $p=0,74$ ). Con respecto a la producción de %CH<sub>4</sub>, SM1, SE1, SA2 y SAG2 evidenciaron una reducción significativa ( $p=0,018$ ;  $p=0,019$ ;  $p=0,0198$  y  $p=0,0168$ , respectivamente) respecto de D0. Por otro lado, la producción MMSi, se redujo en todos los tratamientos, pero solo SE1, SM2, SAG2, SE2, SM1 y SA2 lo hicieron de manera significativa ( $p=0,023$ ;  $p=0,021$ ;  $p=0,031$ ;  $p=0,014$ ;  $p=0,026$ ;  $p=0,019$ , respectivamente). De igual manera MMOi resultó disminuida por SE1, SA2 y SAG2 ( $p=0,02$ ;  $p=0,014$  y  $p=0,017$ , respectivamente). La

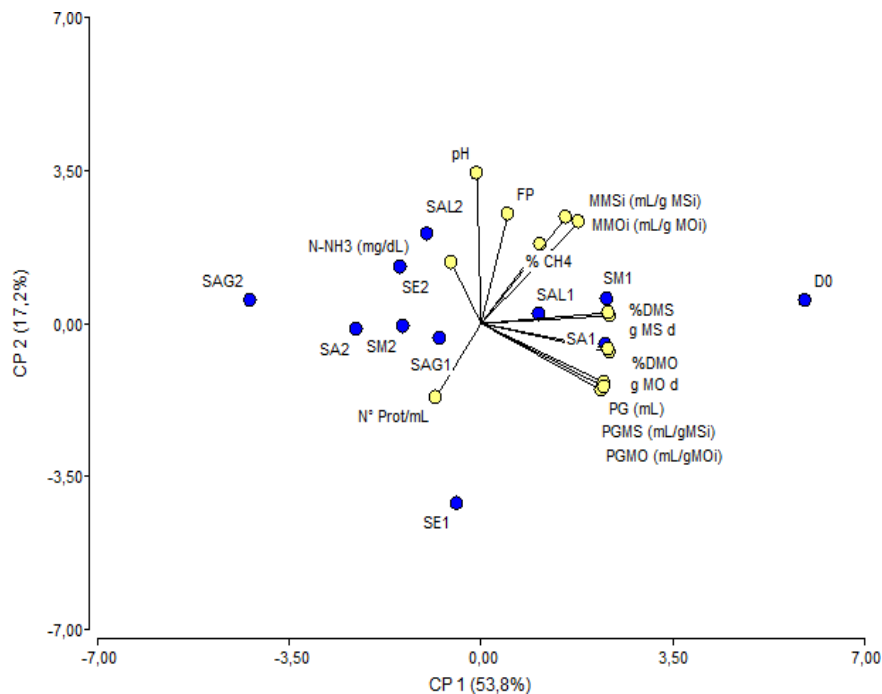
mayor disminución se obtuvo con SE1, donde se alcanzó una reducción del 20,1% (MSi) y 22,4% (MOi) con respecto a la D0. En cuanto a la degradabilidad de la MSi, exceptuando los tratamientos SA1, SAL1 y SM1 ( $p=0,17$ ;  $p=0,054$  y  $p=0,95$ , respectivamente), todos los demás tratamientos registraron una reducción significativa, comparados a la D0. La degradabilidad de la MOi se vio afectada de manera negativa en todos los tratamientos, excepto en SM1, donde la reducción fue de solo 2,8% ( $p=0,37$ ), mientras que el rango de reducción varió entre 2,8% en SM1 y 12,7% en SAG2.

La figura 6 (a y b) muestra el efecto relativo de la degradabilidad del sustrato (tanto en MS como en MO) de los tratamientos con relación a la producción de metano. Para el tratamiento SE1, la reducción en la cantidad de metano supera al 20% respecto a la D0, mientras que la degradabilidad del sustrato se vio reducida en un máximo de 12,7% (SAG2) y un mínimo de 1,3% (SM1) respecto a la D0.



**Figura 6:** a) Reducción relativa respecto al control de la producción de metano (mL/gMSi) y la degradabilidad de la MSi del sustrato (g/g). b) Reducción respecto al control de la producción de metano (mL/gMOi) y la degradabilidad de la MOi del sustrato (g/g). Puntos (•): D0: dosis cero; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; SA1: suico en acetona 1 g/L; SA2: suico en acetona 2 g/L; SAL1: suico en alcohol 1 g/L; SAL2: suico molido 2 g/L; SAG1: suico en agua 1 g/L; SAG2: suico en agua 2 g/L

El ACP se realizó a partir de los datos estandarizados correspondientes a los tratamientos de TM, donde las dos primeras componentes principales explicaron el 71% de la variabilidad total observada (Figura 7). La CP1 explicó la mayor variabilidad (53,8%) y mostró que las variables con mayor inercia fueron la producción de gas y la degradabilidad (%DMS, %DMO), así como el número de protozoos/mL. Dichas variables separan a SAL1, SM1, SA1, D0 y SAG2 del resto de los tratamientos. El eje 2 representó el 17,2% de la variabilidad, donde las variables con mayor peso fueron el pH y el número de protozoos/mL, separando a los tratamientos SE1 y SAL2 del resto.



**Figura 7:** Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para TM. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2.

### 2.4.3. Parámetros bioquímicos de la fermentación *in vitro*

El patrón obtenido para ambas especies es similar dado que, tanto el pH, como el contenido de protozoos (N°/mL) y el FP no se vieron influenciados significativamente con la adición del material vegetal y sus extractos. Sin embargo, el contenido de N-NH<sub>3</sub> en LT fue significativamente mayor en los tratamientos PM1, PM2, PA1, PAL1, PAL2 y

PAG1 ( $p < 0,001$ ) (Cuadro 4). En TM, todos los tratamientos aumentaron la concentración respecto a D0, excepto SM1 y SAG2 que no mostraron diferencia ( $p > 0,05$ ) (Cuadro 5).

Con respecto a los resultados obtenidos para AGV, el patrón en ambas especies fue diferencial (Cuadros 4 y 5). En LT los tratamientos que resultaron significativos para la producción de Propiónico fueron PA1, PAL1, PE1, PE2, PM1 y PM2 ( $p < 0,0001$ ). Solo PA1 y PAL1 causaron una reducción respecto a la D0 de 29% y 25%, respectivamente. En tanto, PE1, PE2, PM1 y PM2 aumentaron la cantidad de Propiónico hasta en un 100% en el caso de PM1. Con respecto a la producción de Acético, PA1, PA2 y PAL1 lo redujeron de manera significativa, llegando a un máximo de 36% en PAL1. Contrariamente, PE1, PM1 y PM2 aumentaron ( $p < 0,0001$ ) la producción hasta en un 49% con PM1. La relación A/P resultó disminuida de manera significativa ( $p < 0,05$ ) por PE2 y PM1, en 15% y 28%, respectivamente. La producción de AGV totales disminuyó ( $p < 0,005$ ) con los tratamientos PA1, PA2 y PAL1 (30%, 25% y 40%, respectivamente), mientras que PE1, PM1 y PM2 aumentaron la producción ( $p < 0,05$ ) en 18%, 56% y 25%, respectivamente.

Por su parte, el TM presentó un comportamiento diferente. Respecto a la producción de Propiónico, los tratamientos SA1, SA2, SAG1, SAG2, SAL1, SAL2, SE2, SM1 y SM2 resultaron en una disminución que varió entre 10% con SAL2 y 46% con SA2 respecto a la D0 ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la producción de Acético, los tratamientos SA1, SA2, SAL1, SE2, SM1 y SM2 lo redujeron ( $p < 0,005$ ). SAL1 y SE2 disminuyeron en 10%, mientras que SA2 lo hizo en 33%. La relación A/P solo resultó afectada con los tratamientos SA1 y SA2 ( $p < 0,0001$ ), aumentando en 20% y 26%, respectivamente. La producción total de AGV fue disminuida ( $p < 0,05$ ) con los tratamientos SA1, SA2, SAL1, SE2, SM1 y SM2, con un mínimo de 17% en SAL1 y un máximo de 42% con SA2.

**Cuadro 4:** Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT sobre el pH, la producción de AGV, cantidad de protozoos, el contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en relación a la D0.

<b>Variables</b>	<b>D0</b>	<b>PM1</b>	<b>PM2</b>	<b>PE1</b>	<b>PE2</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PAL1</b>	<b>PAL2</b>	<b>PAG1</b>	<b>PAG2</b>	<b>EE</b>	<b>p-valor ANAVA</b>
<b>pH</b>	6,89	6,87	6,89	6,89	6,90	6,89	6,88	6,89	6,89	6,88	6,88	0,011	0,7259
<b>AGV totales (mM)</b>	68,63	107,22 <sup>***</sup>	85,70 <sup>***</sup>	80,72 <sup>*</sup>	75,22	48,22 <sup>***</sup>	51,35 <sup>***</sup>	43,31 <sup>***</sup>	65,33	60,18	67,38	4,055	<0,0001
<b>A/P</b>	3,37	2,44 <sup>***</sup>	3,41	3,42	2,86 <sup>*</sup>	3,59	2,99	3,04	3,32	3,69	3,11	0,107	<0,0001
<b>Acetato (mM)</b>	44,56	66,61 <sup>***</sup>	59,28 <sup>***</sup>	58,23 <sup>***</sup>	50,28	33,06 <sup>***</sup>	34,63 <sup>***</sup>	30,05 <sup>***</sup>	42,74	39,57	42,66	2,321	<0,0001
<b>Propionato (mM)</b>	13,29	27,52 <sup>***</sup>	17,56 <sup>***</sup>	17,15 <sup>***</sup>	17,91 <sup>***</sup>	9,41 <sup>***</sup>	11,62	9,95 <sup>**</sup>	13,01	11,87	13,68	0,916	<0,0001
<b>Protozoos (N° x 10<sup>-3</sup>/mL)</b>	5,34	4,55	4,60	4,50	7,16	2,98	5,70	5,72	8,19	4,25	8,94	1,780	0,3537
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg/dL)</b>	23,01	25,45 <sup>***</sup>	25,62 <sup>***</sup>	23,94	23,66	25,24 <sup>***</sup>	23,85	24,11 <sup>*</sup>	24,66 <sup>***</sup>	25,14 <sup>***</sup>	22,80	0,440	<0,0001
<b>FP (mg MS degr/mL gas)</b>	4,07	4,01	4,11	3,99	4,17	4,03	4,13	4,11	4,19	3,91	4,21	0,162	0,5709

D0: dosis cero; PM1: poley molido 1 g/L; PM2: poley molido 2 g/L; PE1: poley en éter 1 g/L; PE2: poley en éter 2 g/L; PA1: poley en acetona 1 g/L; PA2: poley en acetona 2 g/L; PAL1: poley en alcohol 1g/L; PAL2: poley molido 2 g/L; PAG1: poley en agua 1g/L; PAG2: poley en agua 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a D0.

**Cuadro 5:** Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de TM sobre el pH, la producción de AGV, cantidad de protozoos, el contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en relación a la D0.

<b>Variables</b>	<b>D0</b>	<b>SM1</b>	<b>SM2</b>	<b>SE1</b>	<b>SE2</b>	<b>SA1</b>	<b>SA2</b>	<b>SAL1</b>	<b>SAL2</b>	<b>SAG1</b>	<b>SAG2</b>	<b>EE</b>	<b>p- valor ANAVA</b>
<b>pH</b>	6,89	6,89	6,87	6,85	6,90	6,89	6,88	6,89	6,88	6,88	6,90	0,010	0,2268
<b>AGV totales (mM)</b>	68,63	53,82 <sup>***</sup>	53,74 <sup>***</sup>	66,08	55,59 <sup>***</sup>	49,73 <sup>***</sup>	40,09 <sup>***</sup>	56,90 <sup>***</sup>	65,43	63,50 <sup>*</sup>	62,27	2,609	<0,0001
<b>A/P</b>	3,37	3,40	3,50	3,47	3,56	3,96 <sup>***</sup>	4,17 <sup>***</sup>	3,60	3,69	3,67	3,32	0,122	0,0009
<b>Acetato (mM)</b>	44,56	35,66 <sup>***</sup>	36,35 <sup>***</sup>	43,51	39,90 <sup>*</sup>	36,55 <sup>***</sup>	29,93 <sup>***</sup>	40,02 <sup>*</sup>	44,19	43,45	43,07	1,443	<0,0001
<b>Propionato (mM)</b>	13,29	10,53 <sup>***</sup>	10,46 <sup>***</sup>	12,60	11,30 <sup>***</sup>	9,35 <sup>***</sup>	7,22 <sup>***</sup>	11,31 <sup>***</sup>	12,04 <sup>*</sup>	11,88 <sup>*</sup>	11,96 <sup>*</sup>	0,651	<0,0001
<b>Protozoos (N° x 10<sup>-3</sup>/mL)</b>	5,34	3,39	8,61	7,37	6,28	4,88	6,14	7,72	4,52	8,69	5,90	1,229	0,1039
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg/dL)</b>	23,01	24,98 <sup>***</sup>	23,87	23,93 <sup>*</sup>	25,23 <sup>***</sup>	24,07 <sup>*</sup>	25,60 <sup>***</sup>	25,09 <sup>***</sup>	25,21 <sup>***</sup>	24,93 <sup>***</sup>	23,39	0,335	<0,0001
<b>FP (mg MS degr/mL gas)</b>	4,07	4,16	4,16	3,93	4,05	3,98	4,02	4,04	4,09	3,94	4,00	0,121	0,1647

D0: dosis cero; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; SA1: suico en acetona 1 g/L; SA2: suico en acetona 2 g/L; SAL1: suico en alcohol 1 g/L; SAL2: suico molido 2 g/L; SAG1: suico en agua 1 g/L; SAG2: suico en agua 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a D0.



## 2.5. Discusión

En la naturaleza se puede hallar una amplia gama de compuestos bioactivos dentro de las plantas, que podrían tener efecto tanto sobre los parámetros de fermentación del rumen como así también sobre el ecosistema ruminal (Bodas *et al.*, 2008; Cieslak *et al.*, 2013). Si bien no existe un consenso en la manera de clasificar o discriminar de forma sencilla a estos compuestos, una aproximación posible es subdividirlos en fracciones de acuerdo a su polaridad (Tian *et al.*, 2009). Asimismo, el criterio para la elección de los solventes se basa en la ausencia de toxicidad sobre los microorganismos del rumen (Patra *et al.*, 2010).

Las dosis de LT y TM fueron elegidas basándose en datos previos de eficacia y seguridad de los compuestos bioactivos. Este nivel de adición podría no ser factible bajo prácticas a campo, pero la situación podría ser diferente si se lograra extraer o sintetizar los compuestos bioactivos (García-González *et al.*, 2008a).

Los niveles de MS y MO obtenidos en este trabajo para ambas especies (Cuadro 1) son acordes a los valores esperados para muestras obtenidas en zonas de clima árido (Medjekal *et al.*, 2017). Lo mismo sucede con el contenido de fibra, que tiende a incrementarse en regiones con bajo nivel de precipitaciones y altas temperaturas durante el ciclo de crecimiento y recolección. Estas características se acercan a la composición química de componentes de dietas típicas en sistemas de producción animal. De acuerdo a la caracterización nutricional del material vegetal y los extractos utilizados como así también la dieta base, se observa que sus características fueron similares, por lo que esto no debería influir sobre los patrones de fermentación. En estudios previos realizados en nuestro equipo de trabajo (García *et al.*, 2018; 2020), se observó que los AE de LT y TM lograron disminuir de manera significativa la producción de CH<sub>4</sub> sin alterar la degradabilidad del sustrato. Los compuestos bioactivos que se encuentran en los vegetales

se presentan normalmente como mezclas de muchos componentes y pueden tener efectos importantes tanto directamente sobre los metanógenos del rumen, o indirectamente al afectar a los protozoos o la degradabilidad del sustrato (Cieslask *et al.*, 2013).

En un estudio llevado a cabo con una especie vegetal tradicionalmente usada en medicina como la *Galla chinensis*, Tian *et al.* (2009) realizaron una extracción consecutiva de componentes mediante solventes de polaridades variadas. Luego de enfrentar cada fracción a diversas especies bacterianas, observaron que todas las fracciones presentaron actividad antimicrobiana, encontrando una relación inversa entre la polaridad del solvente y la capacidad antimicrobiana del extracto. Banik *et al.* (2016) por su parte, lograron obtener una mayor actividad cuando probaron una mezcla de metanol y cloroformo (50:50) en la especie *Biserrula pelencis* L. En este caso la mayor actividad antimicrobiana se explicaría quizás por la mezcla de solventes hidrofílicos e hidrofóbicos. A diferencia de lo antes mencionado, en el presente trabajo se detectó que los compuestos bioactivos presentes en PA y PAL lograron una disminución significativa en la producción de CH<sub>4</sub>, sin afectar la degradabilidad del sustrato, pero solo usando la menor dosis. Estos datos sugieren que los componentes bioactivos que quedaron en las fracciones de acetona y alcohol de LT afectaron de manera selectiva las *archaeas* metanogénicas, actuando de manera directa (Cieslask *et al.*, 2013). En cambio, el patrón obtenido con las extracciones en TM fue diferente, ya que la producción de CH<sub>4</sub> resultó afectada tanto con éter, como con acetona y agua, al igual que la degradabilidad del sustrato, lo que sugiere que la manera de actuar sobre la metanogénesis es indirecta (Cieslask *et al.*, 2013).

Los hallazgos del presente trabajo no permiten explicar totalmente el efecto bioactivo basado en las polaridades de cada solvente utilizado, como así tampoco lo puede hacer la dosis de inclusión. Sin embargo, si se comparan los resultados previos de nuestro

grupo de trabajo, focalizados en los efectos de los AE de LT y TM con los expuestos en el presente capítulo, es posible evidenciar la presencia de compuestos bioactivos en las plantas y los extractos una vez que los elementos volátiles que componen los AE fueron eliminados con los solventes (García *et al.*, 2018; 2020). Por lo expuesto, se puede sugerir que en el caso de las especies estudiadas, existe actividad antimicrobiana tanto en la fracción sólida como en la fracción volátil de las mismas.

Existe un debate sobre la relación existente entre protozoos y la emisión de CH<sub>4</sub>. La asociación entre metanógenos y protozoos se ha demostrado mediante el uso de sondas de ARNr 16S, pero también se comprobó que la mayoría de los metanógenos viven libremente en la porción líquida del contenido del rumen (Sharp *et al.*, 1998), por lo que es posible que la metanogénesis en el rumen no siempre esté correlacionada con la cantidad de metanógenos (Broudiscou *et al.*, 2000; Machmüller *et al.*, 2003; Ehtesham *et al.*, 2018). Finlay *et al.* (1994) y Hegarty (1999) mencionan que las *archaeas* metanogénicas se correlacionan metabólicamente con los protozoos ciliados y que la eliminación de estos del rumen reduciría la emisión de CH<sub>4</sub> entre 30-45%. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la actividad de los protozoarios no está esencialmente relacionada con los microorganismos metanogénicos en el rumen (Patra *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011). Patra *et al.* (2006) y Kumar *et al.* (2011) obtuvieron actividad antimetanogénica y efecto antiprotozoal con extracto metanólico de *T. chebula* y extractos etanólico y metanólico de *M. indica* y *E. jabolana*. Mientras que Patra *et al.* (2006) por otro lado lograron disminuir la cantidad de protozoos ciliados, pero sin inhibirla metanogénesis con extractos acuoso y etanólico de *F. religiosa*. En el presente trabajo el número de protozoos no resultó modificado de forma significativa con ninguna de las dos especies probadas, pero si lo hizo la producción de CH<sub>4</sub>. Estos resultados sugieren que es posible manipular diferencialmente las poblaciones de

*archaeas* metanogénicas y de protozoos mediante el uso de compuestos bioactivos provenientes de LT. En efecto, los compuestos bioactivos presentes en PAL reducirían las poblaciones de *archaeas* metanogénicas sin deprimir a los microorganismos protozoarios.

De acuerdo a Blümmel *et al.* (1997), la producción de gas es un parámetro útil para estimar la desaparición del sustrato y el FP para reflejar la eficiencia de fermentación. Nuestros resultados indican que el FP se mantuvo inalterado. Con respecto a la producción de gas, si bien los valores son menores a la D0, se considera que estas reducciones no serían de importancia biológica. Al igual que García-González *et al.* (2008b), la producción de gas se redujo a medida que se incrementó la dosis cuando usaron *Rheum officinale* y *Fragula annus*, alcanzando un máximo de reducción de 17%. Esto podría deberse al alto contenido de FDN y FDA de los materiales incubados, ya que constituyen el factor limitante de la degradabilidad del sustrato *in vitro* (Kumar *et al.*, 2011; Medjekal *et al.*, 2017). En contraste, la inclusión de extractos de *Acacia concinna*, *Emblica officinalis* y *Terminalia belerica* (estas dos últimas ricas en compuestos fenólicos), incrementó la producción de gas debido quizás a que quedaron más azúcares solubles cuando se extrajeron con varios solventes (Patra *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011). La reducción en la producción de gas en este trabajo se podría dar debido a la incapacidad de algunos microorganismos para degradar los componentes aportados (Jiménez-Peralta *et al.*, 2011), limitaciones en crecimientos de ciertas especies ruminales o la disminución en la producción de CH<sub>4</sub> (Patra *et al.*, 2006; Durmic *et al.*, 2014).

Varios estudios evidencian que la producción de CH<sub>4</sub> derivada de la fermentación ruminal puede ser disminuida con compuestos bioactivos provenientes de algunas plantas (Newbold *et al.*, 2004), AE de LT y TM (García *et al.*, 2018; 2020), compuestos fenólicos (Patra *et al.*, 2006; García-González *et al.*, 2008b; Pal *et al.*, 2015), saponinas (Hess *et al.*, 2003; Kamra *et al.*, 2006), taninos (Tan *et al.*, 2011; Kumar *et al.*,

2011), flavonoides (Oskoueian *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015), como así también con extractos metanólicos (Patra *et al.*, 2006). No todas las plantas ni los compuestos bioactivos son capaces de reducir la producción de CH<sub>4</sub>, como se puede apreciar tanto en este trabajo como en los de Patra *et al.* (2006), Bodas *et al.* (2008) y Durmic *et al.* (2010). La incorporación de PAL1, al igual que *Nigella sativa* (Medjekal *et al.*, 2017), no produjo cambios sustanciales en el perfil general de fermentación, a excepción de la producción de CH<sub>4</sub>, que disminuyó de manera significativa. Estos resultados sugieren que los compuestos bioactivos presentes, en la dosis utilizada, no impactarían de manera significativa en la actividad fermentativa de los principales microorganismos del rumen, exceptuando a las *archaeas* metanogénicas.

La degradabilidad del sustrato resultante de las incubaciones tanto para LT como para TM fue variable, lo que podría deberse a características inherentes a la composición química de cada material concordando con lo hallado por Pal *et al.* (2015).

La producción de gas está relacionada estequiométricamente con los perfiles de AGV. Aunque las vías de fermentación están limitadas en parte por la termodinámica (Ungerfeld *and* Kohn, 2006), el perfil de los productos (por ejemplo, gases o AGV) podría influir en las vías posteriores. En este sentido, cuando se inhibe la metanogénesis, sería esperable un cambio en la producción de Acético hacia Propiónico (Van Nevel *and* Demeyer, 1996). Sin embargo, reciente evidencia muestra inconsistencias a la hora de comprender más acerca de esta inhibición. Ungerfeld *et al.* (2019) probaron 8 tipos de inhibidores químicos de la metanogénesis, pero no hallaron una mejora en la producción de Propiónico, debido quizás a que los hidrógenos remanentes se redireccionaron a otra ruta metabólica. Se espera que estos hidrógenos puedan incorporarse a otras vías metabólicas alternativas reduciendo su acumulación, para no afectar la fermentación del sustrato (Durmic *et al.*, 2014).

En este trabajo, la disminución en la producción de CH<sub>4</sub> en respuesta a la adición de algunos tratamientos (PA2, PAL1, SE1, SA2, SAG2) fue acompañada por un cambio significativo en las proporciones de AGV. Sin embargo, las respuestas ante el incremento de dosis en los tratamientos no resultaron dosis-dependientes, como lo reportado en el trabajo de García-González *et al.* (2008b). Debido a que la producción de Acético y Propiónico es mayoritaria con respecto a los demás AGV, el efecto de estos determinaría los cambios en la producción total de AGV. No siempre una disminución en la producción de Acético resultó compensada con un aumento en la producción de Propiónico (PA1, PA2, SA1, SA2, SAL1, SE2, SM1 y SM2), en acuerdo con Durmic *et al.* (2010) y Kumar *et al.* (2011). En términos de la relación A/P, nuestros resultados indican que los tratamientos que disminuyeron CH<sub>4</sub> no mejoraron dicha relación, en contraste con lo hallado por Patra *et al.* (2006) y Durmic *et al.* (2014). Una posible explicación a esta inconsistencia es la falta de una correlación lo suficientemente fuerte entre la producción de CH<sub>4</sub> y Propiónico, lo que implicaría la existencia de vías metabólicas alternativas para el H<sub>2</sub> removido del rumen (Durmic *et al.*, 2010; Ungerfeld *et al.*, 2019). Respecto a la producción de Acético, su reducción podría deberse a una disminución en la actividad de las bacterias formadoras de este AGV o una reducción en la producción de H<sub>2</sub>, pudiendo verse reflejado de manera adversa sobre la degradabilidad del sustrato (Akanmu *et al.*, 2020). La disminución de Acético en el tratamiento PAL1 no resultó en una reducción en la degradabilidad de la MO, contrario a lo hallado en los otros tratamientos de LT y TM.

El análisis de ACP muestra colectivamente que los cambios en los parámetros de fermentación se presentan de forma diferencial, según la especie y el tratamiento con el solvente. Al igual que en trabajos anteriores utilizando el AE de estas especies, se puede evidenciar la acción directa o indirecta en cada una de ellas respecto de la manera

de actuar sobre la fermentación. Garcia *et al.* (2018; 2020) encontraron que el AE de LT resultó más efectivo al momento de reducir la metanogénesis, lo que se podría explicar por la presencia mayoritaria de limonene y terpenos oxigenados, mientras que el AE de TM está compuesto mayoritariamente por compuestos oxigenados.

Con base en los resultados descritos anteriormente, la hipótesis de trabajo se acepta parcialmente porque solamente los tratamientos PM2, PA2, PAL1, SM1, SM2, SE1, SE2, SA2, SAG2 mostraron actividad antimicrobiana significativa disminuyendo la producción de metano. A su vez, en ninguno de los tratamientos se observó alteración en la cantidad de protozoos.

## **2.6. Conclusión**

La búsqueda de nuevos aditivos para alimentación animal debe basarse en una colección de candidatos con antecedentes de bioactividad, evaluándose primeramente en sistemas de cultivo *in vitro*. Las diferencias en la actividad de los compuestos bioactivos de las plantas y extractos, no solo se deben a su diferente naturaleza química, sino también a otros factores que pueden influir en su concentración y actividad dentro de una especie dada, como así también posibles acciones de sinergismo entre los compuestos.

Este trabajo brinda suficiente información para poder seguir explorando las especies LT y TM como moduladores de la fermentación ruminal. La selección de los tratamientos SE1 y PAL1 sobre los efectos en la producción de metano ruminal mostró que ambas especies tienen potencial para reducir la metanogénesis. Específicamente PAL1 no impactó negativamente sobre la degradabilidad del sustrato *in vitro*, sugiriendo que no hubo efectos perjudiciales sobre los microorganismos ruminales, incluyendo a los protozoarios. Dentro de TM, el tratamiento SE1 demostró una potente acción antimetanogénica con la menor dosis utilizada, mostrando mérito para seguir siendo explorado bajo otras condiciones experimentales.

Se comprobó la existencia de compuestos bioactivos aun cuando los compuestos volátiles pertenecientes a los AE fueron eliminados mediante la utilización de los solventes.



## **CAPÍTULO 3**

## **EFECTO DE LOS POLIFENOLES DE *LIPPIA TURBINATA* Y *TAGETES MINUTA* SOBRE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE DOS DIETAS CONTRASTANTES**

### **3.1. Introducción**

Las estrategias orientadas a disminuir la producción de CH<sub>4</sub> originada en el rumen se pueden llevar a cabo mediante la modulación de la fermentación a través del uso de aditivos de alimentos o raciones (Cobellis *et al.*, 2016), como así también el uso de compuestos bioactivos presentes en muchos vegetales. Diversas plantas medicinales y sus derivados poseen actividades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos (Beg *and* Ahmad, 2000). Algunas de estas sustancias han sido identificadas como fenoles y sus derivados (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), saponinas, terpenoides, AE, alcaloides, pectinas y polipéptidos (Thuille *et al.*, 2003; Bodas *et al.*, 2012), entre otras. Estos compuestos tradicionalmente han sido usados en la medicina, pero en la actualidad se explotan en diversos tipos de industrias (Puniya *et al.*, 2015). Las vías de acción son diversas, puesto que algunos suprimen la población de protozoos (Bhatta *et al.*, 2014), otros actúan sobre la producción de Propiónico (Medejkal *et al.*, 2017) y sobre el FP (García-González *et al.*, 2008b), así como en la síntesis de proteínas microbianas y la disminución de la metanogénesis (Tan *et al.*, 2011). La bioactividad de estos compuestos o metabolitos es dependiente del pH del rumen, del sustrato de fermentación donde son incluidos, los métodos de preparación y tipos de solventes utilizados para su obtención (Patra *and* Saxena, 2009; Garcia *et al.*, 2020). Martínez *et al.* (2010) reportaron que la producción de metano *in vitro* resultó afectada por la relación forraje concentrado, tanto en la dieta del animal donador, como el sustrato incubado. Este aspecto debería tenerse en cuenta dado que la composición del sustrato determinaría la producción de H<sub>2</sub> que será metabolizado por los organismos

metanogénicos (Yañez-Ruiz *et al.*, 2016). Por todo lo expuesto, la mitigación de la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen mediante el uso del material vegetal y metabolitos secundarios representa un desafío interesante en la formulación del alimento animal (Sirohi *et al.*, 2009; Patra *and* Yu, 2012).

El primer objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la adición de los materiales vegetales y los extractos de LT y TM, que evidenciaron bioactividad en la etapa anterior, sobre la fermentación ruminal *in vitro* de sustratos que representan dietas de sistemas productivos de cría y tambo. El segundo objetivo fue examinar si la presencia de polifenoles, tanto en los sustratos como en los materiales vegetales y en los extractos, influyen sobre los parámetros de fermentación.

### **3.2. Hipótesis**

La actividad antimicrobiana de los polifenoles presentes en los materiales vegetales y en los extractos de las especies LT y TM es mayor a medida que aumenta su dosis de inclusión y diferencial dependiendo de la composición de la dieta evaluada.

### **3.3. Materiales y métodos**

#### **3.3.1. Material vegetal y obtención de extractos vegetales**

Se utilizaron los extractos obtenidos de los tratamientos seleccionados en el ensayo anterior y el material vegetal molido. Los tratamientos corresponden al material vegetal molido de ambas especies (Banik *et al.*, 2016) y a los extractos de LT en alcohol y TM en éter de petróleo (PAL y SE, respectivamente) en tres dosis (0, 1 y 2 g/L).

#### **3.3.2. Incubación *in vitro***

Se realizaron dos ensayos independientes con la misma metodología mencionada en el capítulo 2 para valorar el material vegetal y los extractos seleccionados con base en diferentes sustratos. Se evaluaron dos sustratos, los cuales simularon dietas contrastantes de sistemas de producción bovina: cría y tambo. Para representar al sistema

de cría se utilizó 100% de *Panicum coloratum* (Pan), mientras que para el sistema de tambo se utilizó una dieta totalmente mezclada (TMR: silaje de maíz 36%, heno de alfalfa 22%, grano de maíz húmedo 24% y expeler de soja 18%). La composición química de los sustratos se muestra en el Cuadro 21 del Anexo. Las incubaciones de cultivos *in vitro* se realizaron de igual manera que en el ensayo anterior. Se usaron tres novillos Hereford con cánula ruminal ( $518 \pm 51$  kg) para obtener el FR para las incubaciones *in vitro*, alimentados con una dieta de heno de alfalfa y grano de maíz molido en una proporción 80:20 en base seca (Cuadro 22 del Anexo). El FR fue homogeneizado y filtrado dos veces a través de una doble capa de gasa en un matraz con agitador magnético mantenido a 39 °C en ambiente de anaerobiosis. El medio de cultivo consistió en 40 mL de una solución *buffer* carbonato-fosfato (Tilley and Terry, 1963) más 10 mL de FR. Para obtener los tratamientos correspondientes a la dosis de 1 g/L se incorporaron 50 mg de extracto en 450 mg de sustrato, excepto en el control donde el mismo alcanzó 500 mg. En el caso de las dosis de 2 g/L, la cantidad de extracto incorporado fue de 100 mg, mientras que de sustrato se agregaron 400 mg. Además, se incluyó un blanco (FR más *buffer*, sin sustrato) usado para corrección de los datos de producción de gas y un control positivo con monensina para cada sustrato (MON), a una concentración de 1,87 mg de monensina pura/L (Option 20%, Brascorp S.A., Buenos Aires, Argentina).

### **3.3.3. Análisis químico del material vegetal, de los extractos, variables y parámetros bioquímicos de fermentación**

El análisis químico del material vegetal, sus extractos y los sustratos se realizó de igual manera que las determinaciones de MS, MO, Cen, PB, FDN, FDA y DMS<sub>iv</sub> de la metodología descrita en el capítulo 2 (Cuadro 1). Además, se les realizó la determinación de fenoles totales (FT), fenoles no tánicos (FNT) y taninos totales (TAN), mediante el método de Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003). Se colocaron 200 mg del material

vegetal, los extractos y los sustratos en 10 mL del disolvente de extracción (acetona en agua, 70:30 v/v), se llevaron a ultrasonido por 20 min, se centrifugó y recolectó el sobrenadante. Se tomaron 20  $\mu$ L del sobrenadante, se añadieron 0,5 mL de agua desionizada, 0,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y 1,25 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 g en 100 mL de agua). Después de 40 min en oscuridad se midió la absorbancia de las muestras a 725 nm en un espectrofotómetro (T60U espectrofotómetro visible, Alma Park, United Kingdom) utilizando como estándar ácido tánico (AT, Merk, Darmstadt, Alemania). El contenido de FT se expresó en mg de equivalentes AT/g muestra en base seca y se determinaron a partir de la extrapolación de la curva de calibración construida por concentraciones estándar de AT. La estimación de FT de cada muestra, se realizó por triplicado. El aporte de FT de los sustratos, extractos y material vegetal se calculó a partir del porcentaje equivalente en un gramo de MS.

Para determinar FNT y TAN se mezcló 1 mL del sobrenadante obtenido anteriormente con 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) en 1 mL de agua desionizada. Luego de centrifugar, se obtuvo otro sobrenadante, del cual se tomaron 60  $\mu$ L para medir el contenido de FT como se indicó anteriormente. El resultado aquí obtenido indica la cantidad de FNT. Para determinar la cantidad de TAN, se procedió a realizar la diferencia entre FT y FNT. También las estimaciones se realizaron por triplicado.

Respecto a las variables de fermentación, el volumen de gas producido se calculó de igual manera que la metodología descrita anteriormente. La producción de gas acumulada se calculó sumando el volumen de gas corregido por la ecuación de regresión y por el blanco para cada sustrato. Además, se estimó la producción de gas respecto a los g de MS incubada (PGMS; mL/gMSi) y por los g de MO incubada (PGMO; mL/gMOi). El volumen total de gas producido hasta las 48 h se recolectó en botellas de 250 mL

selladas herméticamente. La concentración de CH<sub>4</sub> *in vitro* se estimó a partir de una alícuota tomada de este gas recolectado, la cual fue depositada en una botella de muestreo de gases (Exetainer® 12 mL Vial Flat Bottom, LABCO Limited, United Kingdom). Las muestras de gases se analizaron para CH<sub>4</sub> utilizando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus® 580 en el laboratorio de gases de INTA Castelar, equipado con una columna Porapak N 80/100 de 2 m de largo y nitrógeno (N<sub>2</sub>) como gas *carrier*. La temperatura del inyector fue de 120 °C, la columna se mantuvo constante a 90 °C durante el análisis y la temperatura del detector (FID) fue de 380 °C. Las muestras ingresaron al equipo a través de una válvula de volumen muerto de 1 mL, para gases de 6 vías. La degradabilidad *in vitro* de la MS (MS d) y la MO (MO d) se determinó en forma gravimétrica por diferencia de peso (%DMS, %DMO). El contenido de los viales se trasvasó a crisoles previamente pesados (DURAN® 25-851-32 DURAN Produktions GmbH & Co.; Hattenbergstr, Mainz, Alemania), se filtró y dejó en estufa de 105 °C *overnight*. Los residuos secos se pesaron y las cenizas se determinaron a 550 °C por 4 h. La fibra en detergente neutro (FDN) se obtuvo según Van Soest *et al.* (1991); brevemente, el contenido de la botella se transfirió a tubos de 200 mL y se añadieron 100 mL de solución de detergente neutro más  $\alpha$ -amilasa termoestable. Después de hervir durante 1 h, los residuos se filtraron en crisoles de vidrio pesados previamente y se secaron en estufa a 105 °C durante 24 h. Se pesaron los residuos secos y se determinó la ceniza mediante incineración a 550 °C durante 4 h. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el sustrato para determinar la FDN incubada, y por diferencia con los residuos, se obtuvo la cantidad de FDN degradada (FDN d, %DFDN). La cantidad de sustrato degradado se calculó por diferencia entre los g incubados (MS, MO y FDN) menos los g del residuo (luego de la corrección con el residuo del blanco). La fórmula utilizada para el cálculo de la degradabilidad de MS/MO/FDN fue: g MS/MO/FDN degradados / g MS/MO/FDN incubados.

Respecto a los parámetros bioquímicos de fermentación, el N-NH<sub>3</sub> fue determinado mediante el uso de la técnica de espectro colorimetría empleando el kit de uremia (Lab Wiener®, Rosario, Argentina). Los valores de pH se obtuvieron inmediatamente después de las 48 h y se midieron con un peachímetro (Sartorius PT-10, Sartorius AG, Goettingen, Alemania). El FP se determinó mediante la relación entre la MS degradada de cada muestra y la producción de gas (mg MS/mL gas) (Blümmel *et al.*, 1997).

La cuantificación de los protozoos ciliados del rumen se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Dehority (1993) y la fórmula utilizada anteriormente.

### 3.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas biológicas discontinuas en el tiempo (corridas), y en cada una de ellas tres réplicas técnicas (botellas). El análisis se realizó por separado para cada sustrato. Los efectos fijos fueron los extractos evaluados y dosis de inclusión, mientras que cada réplica biológica o corrida fue considerada efecto aleatorio. Los datos se analizaron con modelos lineales generalizados mixtos utilizando el software R 3.6.2. El efecto de cada inclusión (extracto y material vegetal) sobre los parámetros de fermentación (diferencia del control), fue expresado como incremento o disminución (porcentual) respecto del valor del control (García-González *et al.*, 2008a). Se utilizó el *test* de *Dunnnett* para comparar las medias (García-González *et al.*, 2008a). La significancia se declaró cuando  $p \leq 0,05$  y las tendencias fueron discutidas cuando  $p \leq 0,10$ .

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij},$$

$Y_{ij}$  fue la observación,  $\mu$  fue la media general para cada parámetro,  $\tau_i$  fue el efecto del tratamiento ( $i = 1, \dots, 10$ ),  $\beta_j$  fue el efecto de run ( $j = 1, 2, 3$ ) y  $\varepsilon_{ij}$  fue el error residual.

Se realizó un ACP entre la composición química y las variables de fermentación mediante el programa Infostat P (Di Rienzo *et al.*, 2018). Para la determinación de producción de gas se utilizaron todas las réplicas técnicas, mientras que para la determinación de degradabilidad del sustrato y producción de CH<sub>4</sub> se utilizaron dos réplicas técnicas y para determinar el pH, protozoos y N-NH<sub>3</sub> se utilizó una réplica técnica.

Para evaluar las diferencias en el contenido fenólico (FT, FNT y TAN) tanto de los sustratos, el material molido y los extractos, se realizó un ANAVA paramétrico. Posteriormente, se procedió a realizar el *test* de *Tukey*. La significancia se declaró cuando  $p \leq 0,05$  y las tendencias fueron discutidas cuando  $p \leq 0,10$ .

### **3.4. Resultados**

#### **3.4.1. Determinación de fenoles totales (FT), fenoles no tánicos (FNT) y taninos totales (TAN)**

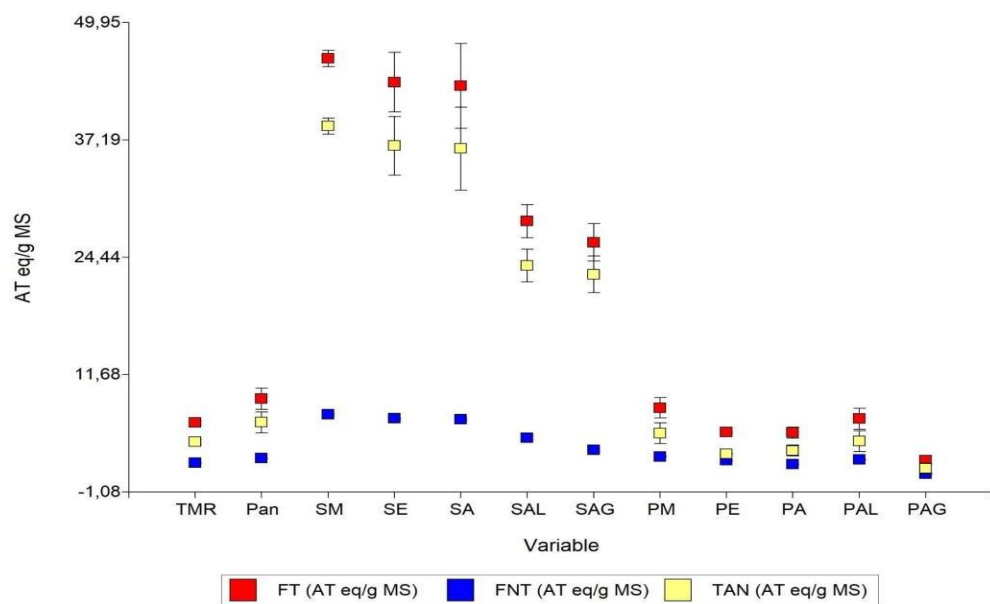
Las concentraciones de FT, FNT y TAN fueron más bajas en PAG y PA que en los otros materiales evaluados. Por otro lado, las mayores concentraciones de estas sustancias se mantuvieron en SM, SE y SA. Las cantidades de estos compuestos resultaron diferentes entre los materiales evaluados ( $p < 0,001$ ) (Cuadro 6, Fig. 8). Por su parte, la cantidad de fenoles aportados en cada tratamiento fue mayor cuando se incorporó TM (tanto el material vegetal como SE) independientemente del tipo de sustrato al cual se incorporó (Cuadro 7).



**Cuadro 6:** Cuantificación de fenoles totales (FT, mg AT eq/g MS); fenoles no tánicos (FNT, mg AT eq/g MS) y taninos totales (TAN, mg AT/g MS) sobre el material vegetal, los extractos y los componentes de los sustratos.

Variables	FT (AT eq/g MS)	FNT (AT eq/g MS)	TAN (AT eq/g MS)			
<b>Sustratos</b>						
<b>Pan</b>	9,07 <sup>a</sup>	2,58 <sup>cd</sup>	6,49 <sup>a</sup>			
<b>TMR</b>	6,45 <sup>a</sup>	2,09 <sup>bc</sup>	4,36 <sup>a</sup>			
<b><i>Tagetes minuta</i></b>						
<b>SM</b>	46,04 <sup>c</sup>	7,36 <sup>g</sup>	38,68 <sup>c</sup>			
<b>SE</b>	43,46 <sup>c</sup>	6,91 <sup>g</sup>	36,55 <sup>c</sup>			
<b>SA</b>	43,46 <sup>c</sup>	6,82 <sup>g</sup>	36,24 <sup>c</sup>			
<b>SAL</b>	43,46 <sup>b</sup>	4,82 <sup>f</sup>	23,53 <sup>b</sup>			
<b>SAG</b>	43,46 <sup>b</sup>	3,48 <sup>e</sup>	22,57 <sup>b</sup>			
<b><i>Lippia turbinata</i></b>						
<b>PM</b>	8,07 <sup>a</sup>	2,76 <sup>d</sup>	5,30 <sup>a</sup>			
<b>PE</b>	5,43 <sup>a</sup>	2,38 <sup>bcd</sup>	3,05 <sup>a</sup>			
<b>PA</b>	5,37 <sup>a</sup>	1,94 <sup>b</sup>	3,42 <sup>a</sup>			
<b>PAL</b>	6,87 <sup>a</sup>	2,43 <sup>bcd</sup>	4,44 <sup>a</sup>			
<b>PAG</b>	2,36 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	1,48 <sup>a</sup>			
	<i>p</i> -valor	<0,001	<i>p</i> -valor	<0,001	<i>p</i> -valor	<0,001
	EE	0,19	EE	0,01	EE	0,19

Pan: *Panicum coloratum*; TMR: dieta totalmente mezclada; D0: dosis cero; SM: suico molido; SE: suico en éter; SA: suico en acetona; SAL: suico en alcohol; SAG: suico en agua; PM: poleo molido; PE: poleo en éter; PA: poleo en acetona; PAL: poleo en alcohol; PAG: poleo en agua. El supraíndice alfabético dentro de cada columna indica diferencias de medias significativas.



**Figura 8:** Contenidos de FT, FNT y TAN en % para el material vegetal, los extractos y los componentes de los sustratos. FT: fenoles totales; FNT: fenoles no tánicos; TAN: taninos totales; Pan: *Panicum coloratum*; TMR: dieta totalmente mezclada; D0: dosis cero; SM: suico molido; SE: suico en éter; SA: suico en acetona; SAL: suico en alcohol; SAG: suico en agua; PM: poleo molido; PE: poleo en éter; PA: poleo en acetona; PAL: poleo en alcohol; PAG: poleo en agua.

**Cuadro 7:** Aporte de fenoles (mg AT eq/g MS) de los sustratos, el material vegetal y los extractos.

Tratamiento	Fenoles aportados (mg AT eq/g MS)		Total mg / g MS
	Sustrato Pan	Extracto	
D0	4,54	0,00	4,54
MON	4,54	0,00	4,54
PAL1	4,08	0,34	4,42
PAL2	3,63	0,69	4,32
PM1	4,08	0,41	4,49
PM2	3,63	0,81	4,44
SE1	4,08	2,17	6,25
SE2	3,63	4,35	7,98
SM1	4,08	2,31	6,39
SM2	3,63	4,61	8,24
	Sustrato TMR	Extracto	
D0	3,25	0,00	3,25
MON	3,24	0,00	3,24
PAL1	3,22	0,34	3,56
PAL2	2,90	0,69	3,59
PM1	3,22	0,40	3,62
PM2	2,90	0,81	3,71
SE1	3,22	2,17	5,39
SE2	2,90	4,35	7,25
SM1	3,22	2,32	5,54
SM2	2,90	4,61	7,51

D0: dosis cero; MON: monensina; PAL1: poleo en alcohol 1 g/L; PAL2: poleo en alcohol 2 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L; PM2: poleo molido 2 g/L; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L.

### 3.4.2. Producción de gas, concentración de metano y degradabilidad *in vitro* de los sustratos

Los efectos de la inclusión tanto de las plantas molidas como de los extractos sobre la producción de gas total, de metano y sobre la degradabilidad del sustrato se presentan en los Cuadros 8 y 9.

Con respecto a la dieta de cría (Pan), la PGMS y PGMO resultaron disminuidas por todos los tratamientos con respecto al D0. La reducción de PGMS varió entre 7,2 y

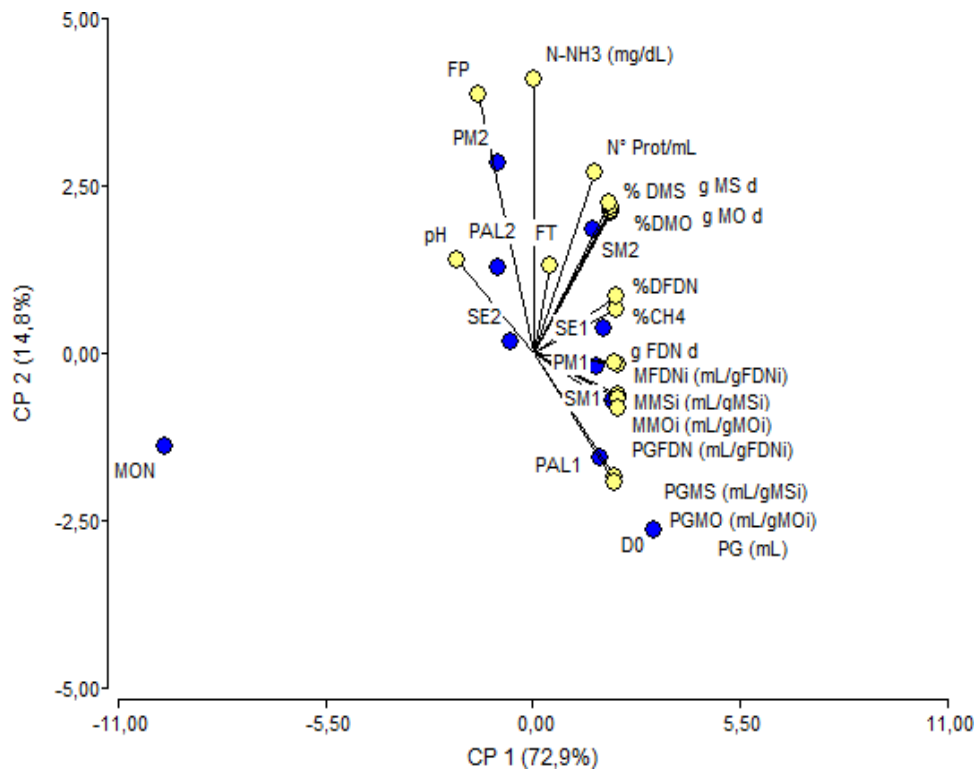
35,7% (SM1 y MON,  $p < 0,001$ ). Asimismo, con PGMO la mayor reducción se obtuvo con el tratamiento MON (35,8%) y la menor con SM1 (7,7%;  $p < 0,001$ ). En cuanto a la producción de %CH<sub>4</sub>, solo MON evidenció una reducción significativa respecto a D0 (48,9%). Respecto a la producción de mL de CH<sub>4</sub> en función de los gramos de MS, MO y FDN incubada (MMSi, MMOi y MFDNi), solo los tratamientos MON, SE2, PAL2 y PM2 redujeron las emisiones de manera significativa ( $p < 0,0001$ ), donde MON redujo alrededor del 65% en las variables. La degradabilidad de la MS disminuyó en el tratamiento MON (21,6%;  $p < 0,001$ ). De igual manera resultó afectada la degradabilidad de la MO, donde MON redujo un 22,0% ( $p = 0,001$ ). Sin embargo, para el tratamiento PM2 se evidenció un aumento de 5,9% ( $p = 0,008$ ). Con respecto a la degradabilidad de la FDN, solo MON disminuyó de manera significativa respecto a la D0 (30%;  $p < 0,001$ ).

A partir de los datos estandarizados se realizó el ACP para Pan, considerando las dos primeras componentes principales que explicaron el 87,7% de la variabilidad total (Fig. 9). En el eje 1 (72,9% de la variabilidad) las variables con mayor peso fueron los mL CH<sub>4</sub> por gramo de MS, MO y FDN, los mL de gas producidos por gramo de FDN y el pH. Estas variables separan claramente a MON del resto de los tratamientos. El eje 2 representa el 14,8% de la variabilidad, donde las variables con mayor peso fueron el FP, el N-NH<sub>3</sub>, producción de gas (PG) y los mL de gas producidos por gramo de MS y MO incubada, separando los tratamientos D0 y PM2 del resto.

**Cuadro 8:** Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT y TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad *in vitro* del sustrato Pan en relación a la D0.

Variables	D0	MON	SE1	SE2	PAL1	PAL2	SM1	SM2	PM1	PM2	EE	<i>p</i> -valor ANAVA
PGMS (mL/gMSi)	150,33	96,57***	134,64***	126,43***	137,60***	121,09***	139,41**	127,26***	134,23***	117,19***	2,957	<0,0001
PGMO (mL/gMOi)	168,32	108,11***	149,73***	140,11***	154,66***	136,77***	155,34***	141,23***	149,92***	130,51***	3,889	<0,0001
%CH <sub>4</sub>	1,80	0,92***	1,82	1,63	1,77	1,63	1,68	1,97	1,80	1,52	0,169	<0,0001
MMSi (mL/gMSi)	2,75	0,95***	2,48	2,03**	2,45	2,00***	2,36	2,50	2,45	1,77***	0,245	<0,0001
MMOi (mL/gMOi)	3,08	1,06***	2,76	2,25**	2,75	2,25**	2,62	2,77	2,73	1,97***	0,274	<0,0001
MFDNi (mL/gFDNi)	3,54	1,23***	3,30	2,80*	3,24	2,71**	3,15	3,47	3,25	2,43***	0,255	<0,0001
MS d (g d/g inc)	0,58	0,47***	0,59	0,58	0,59	0,58	0,59	0,59	0,59	0,60	0,829	<0,0001
MO d (g d/g inc)	0,54	0,42***	0,56	0,55	0,55	0,54	0,55	0,57	0,56	0,58**	0,838	<0,0001
FDN d (g d/g inc)	0,46	0,32***	0,45	0,42	0,45	0,43	0,43	0,45	0,45	0,45	1,121	<0,0001

D0: dosis cero; MON: monensina; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; PAL1: poleo en alcohol g/L; PAL2: poleo en alcohol 2 g/L; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L; PM2: poleo molido 2 g/L; Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.

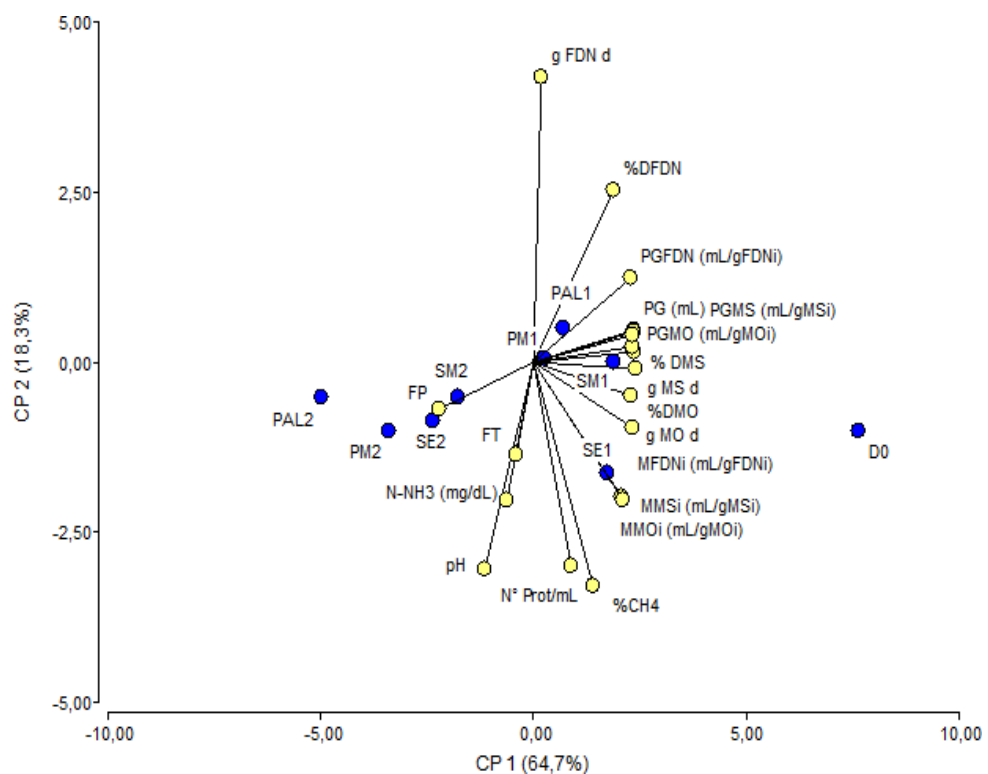


**Figura 9:** Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para el sustrato Pan. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2.

Para la dieta TMR, PGMS y PGMO resultaron disminuidos por los tratamientos con respecto al D0 ( $p < 0,001$ ). En cuanto a PGMS, la reducción varió entre 8,1% y 19% (SM1 y PAL2). De igual modo, la PGMO resultó significativamente afectada por todos los tratamientos, donde la mayor reducción se obtuvo con el tratamiento PM2 (17,9%). En cuanto a la producción de %CH<sub>4</sub>, solo los tratamientos MON (26,4%;  $p < 0,001$ ), PAL2 (19,9%;  $p = 0,011$ ), SM1 (16,9%;  $p = 0,028$ ) y PM1 (16,9%;  $p = 0,041$ ) evidenciaron reducciones con respecto a D0. En relación con la producción de mL de CH<sub>4</sub> en función de los gramos de MS, MO y FDN incubada, todos los tratamientos redujeron las emisiones ( $p < 0,0001$ ), donde la menor reducción se obtuvo con SE1 (entre 15 y 20%) y la mayor con PAL2 (entre 33 y 43%). La degradabilidad de la MS resultó afectada de manera significativa por todos los tratamientos, donde la reducción varió desde 2,9% con SM1 a 7,5% con PAL2. La degradabilidad de la MO resultó afectada de manera negativa

con los tratamientos MON (2,4%;  $p=0,05$ ), SE2 (4,3%;  $p<0,001$ ), PAL1 (2,6%;  $p=0,02$ ), PAL2 (6,4%;  $p<0,001$ ), SM2 (3,7%;  $p<0,001$ ) y PM2 (5,3%;  $p<0,001$ ). Los mismos tratamientos también afectaron de manera negativa la degradabilidad de la fibra ( $p<0,001$ ) donde la mayor reducción se obtuvo con PAL2 (21,2%).

A partir de los datos estandarizados se realizó el ACP para el sustrato TMR, considerando las dos primeras componentes principales que explicaron el 83% de la variabilidad total observada (Fig. 10). La CP1 explicó la mayor variabilidad (64,7%), donde las variables con mayor peso fueron la degradabilidad (%DMS, %DMO), la producción de gas en cualquiera de sus expresiones y el FP. Estas variables separan los tratamientos PAL2 y D0 del resto. Con respecto al eje 2 (18,3% de la variabilidad), las variables con más peso resultaron ser los g de FDN degradados y el %CH<sub>4</sub>, separando PAL1 y SE1 del resto de los tratamientos.



**Figura 10:** Gráfico biplot obtenido a partir del ACP para el sustrato TMR. CP1: componente principal 1; CP2: componente principal 2.

**Cuadro 9:** Efecto de la inclusión de material vegetal y extractos de LT y TM sobre la producción de gas, de metano y la degradabilidad *in vitro* del sustrato TMR en relación a la D0.

<b>Variab</b> les	<b>D0</b>	<b>MON</b>	<b>SE1</b>	<b>SE2</b>	<b>PAL1</b>	<b>PAL2</b>	<b>SM1</b>	<b>SM2</b>	<b>PM1</b>	<b>PM2</b>	<b>EE</b>	<b>p-valor ANAVA</b>
<b>PGMS (mL/gMSi)</b>	246,33	219,56***	218,54***	204,79***	220,54***	199,38***	226,42***	206,24***	218,67***	201,11***	2,711	<0,0001
<b>PGMO (mL/gMOi)</b>	261,33	233,00***	232,18***	217,61***	236,23***	215,63***	242,91***	219,22***	232,54***	214,49***	3,520	<0,0001
<b>%CH<sub>4</sub></b>	3,37	2,48***	3,18	2,95	2,97	2,70*	2,80*	2,88	2,82*	2,88	0,014	<0,0001
<b>MMSi (mL/gMSi)</b>	7,22	4,92***	6,13*	5,30***	5,68***	4,80***	5,60***	5,12***	5,28***	5,15***	0,295	<0,0001
<b>MMOi (mL/gMOi)</b>	8,73	5,78***	7,42*	6,43***	6,92**	5,85***	6,83***	6,37***	6,50***	6,28***	0,338	<0,0001
<b>MFDNi (mL/gFDNi)</b>	26,37	17,51***	21,03***	17,17***	19,19***	14,96***	19,53***	17,28***	18,33***	16,62***	1,305	<0,0001
<b>MS d (g d/g inc)</b>	0,84	0,81***	0,82**	0,80***	0,81***	0,78***	0,82**	0,80***	0,81***	0,79***	0,602	<0,0001
<b>MO d (g d/g inc)</b>	0,83	0,81*	0,82	0,79***	0,80*	0,78***	0,82	0,80***	0,81	0,79***	0,631	<0,0001
<b>FDN d (g d/g inc)</b>	0,50	0,40***	0,46	0,43**	0,44*	0,40***	0,46	0,43*	0,45	0,40***	1,721	<0,0001

D0: dosis cero; MON: monensina; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; PAL1: poleo en alcohol 1 g/L; PAL2: poleo en alcohol 2 g/L; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L; PM2: poleo molido 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.

### 3.4.3. Parámetros bioquímicos de la fermentación *in vitro*

En el sustrato Pan, tanto el pH, el contenido de protozoos ( $N^{\circ}/mL$ ), como la concentración de  $N-NH_3$  no se vieron influenciados significativamente con la adición del material vegetal y sus extractos. Sin embargo, el FP fue afectado por MON, SE2, PAL2 y SM2 ( $p < 0,001$ ) (Cuadro 10).

Cuando se utilizó el sustrato TMR, el pH resultó afectado por MON ( $p = 0,02$ ) y PAL2 ( $p = 0,02$ ). A su vez, MON fue el único que disminuyó la cantidad de protozoos de manera significativa respecto al control (67,3%;  $p = 0,02$ ). El contenido de  $N-NH_3$  no resultó afectado de manera significativa, detectándose solo una tendencia con SE1 ( $p = 0,12$ ). En cuanto al FP, a excepción de SE1 ( $p = 0,19$ ) y PM1 ( $p = 0,40$ ), todos los tratamientos lo modificaron ( $p < 0,001$ ). MON lo aumentó, mientras que el resto lo disminuyó (Cuadro 11).



**Cuadro 10:** Efecto de la inclusión de material vegetal y sus extractos sobre el pH, protozoos, contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en el sustrato Pan en relación a la D0.

<b>Variables</b>	<b>D0</b>	<b>MON</b>	<b>SE1</b>	<b>SE2</b>	<b>PAL1</b>	<b>PAL2</b>	<b>SM1</b>	<b>SM2</b>	<b>PM1</b>	<b>PM2</b>	<b>EE</b>	<b>p-valor ANAVA</b>
<b>pH</b>	6,74	6,77	6,74	6,76	6,74	6,75	6,74	6,74	6,75	6,76	0,015	0,0825
<b>Protozoos (N° x 10<sup>-3</sup>/mL)</b>	7,41	3,38	9,46	5,69	7,14	8,35	10,67	10,61	8,55	9,97	1,969	0,2671
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg/dL)</b>	18,37	18,73	19,73	18,40	18,13	20,37	18,53	20,50	18,97	19,67	0,989	0,5198
<b>FP (mg MS d/mL gas)</b>	3,95	5,13***	3,79	3,22***	3,66	3,29***	3,62	3,23***	3,82	3,70	0,150	<0,001

D0: dosis cero; MON: monensina; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; PAL1: poleo en alcohol 1 g/L; PAL2: poleo en alcohol 2 g/L; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L; PM2: poleo molido 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.

**Cuadro 11:** Efecto de la inclusión de material vegetal y sus extractos sobre el pH, protozoos, contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en el sustrato de TMR en relación a la D0.

<b>Variables</b>	<b>D0</b>	<b>MON</b>	<b>SE1</b>	<b>SE2</b>	<b>PAL1</b>	<b>PAL2</b>	<b>SM1</b>	<b>SM2</b>	<b>PM1</b>	<b>PM2</b>	<b>EE</b>	<b>p-valor ANAVA</b>
<b>pH</b>	6,71	6,67*	6,70	6,72	6,70	6,74*	6,72	6,71	6,70	6,73	0,017	0,0011
<b>Protozoos (N° x 10<sup>-3</sup>/mL)</b>	10,14	3,31*	11,54	5,74	5,74	6,23	11,74	9,88	9,67	9,38	1,656	0,0198
<b>N-NH<sub>3</sub> (mg/dL)</b>	23,42	23,10	27,33	25,37	22,50	25,60	22,60	23,60	25,47	24,10	1,162	0,1175
<b>FP (mg d/mL gas)</b>	3,55	3,80*	3,40	3,03***	3,36*	3,05***	3,20*	3,01***	3,42	3,00***	0,003	<0,0001

D0: dosis cero; MON: monensina; SE1: suico en éter 1 g/L; SE2: suico en éter 2 g/L; PAL1: poleo en alcohol 1 g/L; PAL2: poleo en alcohol 2 g/L; SM1: suico molido 1 g/L; SM2: suico molido 2 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L; PM2: poleo molido 2 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.

### 3.5. Discusión

En el capítulo anterior se concluyó sobre el modo de acción diferencial que presentaron las especies vegetales LT y TM sobre la fermentación ruminal, como así también la permanencia de compuestos bioactivos luego de que el material vegetal es tratado con solventes de diferentes polaridades. Una amplia variedad de compuestos se ha probado en incubaciones *in vitro* con el objeto de manipular la fermentación ruminal, arrojando resultados diversos. Esto podría deberse a factores como las características intrínsecas y dosis del material que se está evaluando, el pH ruminal, las poblaciones microbianas y la dieta administrada a los animales o utilizada como sustrato para las incubaciones *in vitro* (DeRamus *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2020). En este capítulo se cuantificaron los compuestos fenólicos presentes en los materiales vegetales LT y TM y los extractos que evidenciaron bioactividad en el capítulo anterior, evaluándose sus efectos sobre la fermentación ruminal con distintas dietas.

La dieta es uno de los factores más relevantes que afecta tanto a la producción de CH<sub>4</sub> como a las poblaciones microbianas ruminales, y por consiguiente a los productos de fermentación (Weimer *et al.* 1998; Canul Solis *et al.*, 2020). Como lo indican Johnson and Johnson (1995), existen dos factores principales por los cuales se producen las variaciones en la producción de CH<sub>4</sub>. El primero corresponde a la cantidad y calidad de carbohidratos fermentados en el retículo-rumen, mientras que el segundo factor se refiere a la relación de AGV producidos, la cual regula la producción de H<sub>2</sub> y consecuentemente de CH<sub>4</sub>. Además, los compuestos bioactivos presentes en las dietas de manera natural o como suplemento (polifenoles, saponinas y AE entre otros) afectan la fermentación y modulan el comportamiento de las poblaciones microbianas dentro del rumen (Vasta *et al.*, 2019).

La presencia de polifenoles en las dietas de animales es común, ya que por ejemplo, una vaca en pastoreo consume alrededor de 500 g al día de estos compuestos (Fraisie *et al.*, 2007; Landau *et al.*, 2000). Respecto a los sustratos utilizados en este trabajo, Pan contiene mayor cantidad de polifenoles que TMR, quizás debido a que presenta una abundancia superior de lignina (Bravo, 1998). La inclusión de diferentes tipos de forrajes que contienen compuestos fenólicos en las dietas ha demostrado disminuir la emisión de CH<sub>4</sub> tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, obtener mejoras en el uso del nitrógeno (Patra and Saxena, 2011) y modular el perfil de AGV (Tavendale *et al.*, 2005; Jayanegara *et al.*, 2015). Por otra parte, los polifenoles pueden tener efectos adversos sobre algunos microorganismos, ya que alteran sus membranas interactuando con las proteínas de la misma (da Cruz Cabral *et al.*, 2013) o inhiben la actividad enzimática (Patra *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011). En contrapartida, estos compuestos pueden disminuir el consumo voluntario ya que afectan la palatabilidad aumentando la astringencia (Patra and Saxena, 2011) y reduciendo la digestibilidad de la fibra (Barry and McNabb, 1999; Hervás *et al.*, 2003). La degradación de la fibra requiere una serie de pasos consecutivos, donde uno de ellos es la fijación de los microorganismos a las paredes celulares, el cual se piensa que puede ser inhibido por estos compuestos (McAllister *et al.*, 1994).

En lo que respecta a composiciones químicas de plantas medicinales y metabolitos secundarios, los AE han sido los más estudiados, mientras que los compuestos polifenólicos no han recibido tanta atención (Tereschuk *et al.*, 1997; Wernert *et al.*, 2009). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, con la característica de tener un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y han adquirido importancia debido a su amplio rango de actividad biológica, en particular las propiedades antimicrobianas reportadas (Oskoueian *et al.*, 2013).

La cantidad de fenoles provenientes de las especies bajo estudio en este trabajo es consistente con el rango encontrado en la literatura (Kumar *et al.*, 2011; Pal *et al.*; 2015; Canul-Solis *et al.*, 2020). Asimismo, las variaciones observadas en el contenido de FT, FNT y TAN entre especies (Cuadros 6 y 7) podrían atribuirse tanto a factores genéticos como así también a la polaridad de los solventes o al tipo de compuesto fenólico presente y/o sus mezclas (Tereschuk *et al.*, 1997; Bravo, 1998; Garcia *et al.*, 2020). En el capítulo anterior, los extractos PAL y SE fueron los que presentaron la mayor bioactividad con respecto al resto de los materiales probados. Además, se pudo observar la manera diferencial de actuar de LT y TM directa e indirecta, respectivamente, sobre la metanogénesis (Cieslask *et al.*, 2013). La cantidad de compuestos fenólicos fue mayor en TM, independientemente del solvente utilizado o de la presentación física del material. Sin embargo, aun así, ambas especies tuvieron bioactividad, lo que concuerda con los datos presentados con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Garcia *et al.*, 2020). Algunos compuestos fenólicos presentes podrían ser comunes entre los materiales probados, pero a la vez también pueden presentar compuestos únicos o diferentes combinaciones entre ellos, lo que destaca la naturaleza múltiple de la bioactividad de los compuestos derivados de estas especies vegetales (Tereschuk *et al.*, 1997; Banik *et al.*, 2016; Vasta *et al.*, 2019). Jayanegara *et al.* (2013) probaron la combinación de cuatro forrajes con perfiles fenólicos diferenciales (FT, TAN, FNT), observando un sinergismo en la reducción de la producción de CH<sub>4</sub> independientemente del perfil fenólico. Broudiscou *et al.* (2000) trabajaron con 14 extractos de plantas con altas concentraciones de compuestos de la fracción TAN en cultivo continuo y determinaron que dos de ellos (*E. arvense* y *S. officinalis*) mostraron mayor acción inhibitoria sobre la producción de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, se reportaron tres extractos que presentaron los mismos compuestos fenólicos, pero no mostraron bioactividad. En

coincidencia, en el presente trabajo se pudo observar que el contenido de FT y TAN en LT no varió entre los tratamientos (hubo una ligera variación en FNT), pero solo se detectó una marcada actividad antimetanogénica con la inclusión de los tratamientos PM y PAL. Este comportamiento puede deberse al tipo de compuestos fenólicos, puesto que los TAN se encuentran conjugados con azúcares o glucósidos, lo cual puede reducir su bioactividad (Sengul *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2012). Asimismo, algunos TAN son susceptibles a la degradación por ciertos microorganismos (Bravo, 1998). Oskoueian *et al.* (2013) probaron siete compuestos pertenecientes al grupo de los TAN en cultivo *in vitro*. Algunos de ellos redujeron la producción de gas, el CH<sub>4</sub>, la degradabilidad del sustrato, así como las poblaciones de *archaeas* metanogénicas y protozoos. En el presente trabajo se observó el mismo patrón en el sustrato TMR con los tratamientos SE1, SM1 y PM1 con respecto a producción de gas y CH<sub>4</sub>, pero la degradabilidad del sustrato y los protozoos no fueron afectados. En Pan, en cambio, si bien la producción de gas disminuyó, la producción de CH<sub>4</sub> no lo hizo (excepto con SE2, PAL2 y PM2). Makkar (2003) estima que los vegetales con un contenido de FT y TAN de 4,5% y 2% respectivamente (expresados como AT/eq) no producirían efectos adversos significativos en el rumiante. Basado en esto, los mayores contenidos de FT y TAN detectados en los materiales provenientes de TM, podrían explicar la reducción de la degradabilidad del sustrato observada en los tratamientos que incluían estos materiales.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la polaridad de los solventes afecta el rendimiento de los fenoles y por lo tanto las actividades antioxidantes y antimicrobianas (Tian *et al.*, 2009; Banik *et al.*, 2016). En varios trabajos *in vitro* (Kumar *et al.*, 2011; Akanmu *et al.*, 2020) se observó que el uso de metanol como solvente resultó ser el mejor para la obtención de compuestos fenólicos (Bravo, 1998), contrario a lo expuesto por Tian *et al.*

(2009) en cuanto a la relación entre polaridad y bioactividad. Nuestros resultados sugieren que el vínculo entre polaridad y capacidad antimicrobiana no siguió esa tendencia, ya que se detectó bioactividad tanto con solventes polares como el etanol y no polares como el éter. Más aún, con estas dietas utilizadas hubo efecto antimicrobiano en tratamientos que no incluyeron solventes (PM y SM).

Varios estudios coinciden en que las características de la dieta influyen sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> (Johnson *and* Johnson, 1995; Yan *et al.*, 2010). Dietas basadas en forrajes de baja calidad generalmente tienden a producir mayor intensidad en las emisiones de CH<sub>4</sub>, mientras que aquellas basadas en granos, la reducen. Esto se atribuye a la fermentación del almidón en el concentrado, ya que produce más Propiónico y Butírico que la celulosa en el forraje, compitiendo con la metanogénesis por los H<sub>2</sub> (Murphy *et al.*, 1982). Por otra parte, la ingesta alta de almidón puede disminuir el pH ruminal, lo que inhibe el crecimiento de metanógenos, pero también puede comprometer la digestibilidad de la fibra (Van Kessel *and* Russell, 1996; Lana *et al.*, 1998). Sin embargo, esta no es una explicación definitiva, ya que el genoma del ecosistema ruminal es dinámico y podría existir transferencia horizontal de genes que den lugar a la coexistencia de diferentes rutas de fermentación (Janssen, 2010).

La inclusión de SE, PM y PAL en el sustrato Pan disminuyó la cantidad de CH<sub>4</sub> cuando se usó la mayor dosis, sin afectar de manera negativa la degradabilidad del sustrato. En cambio, todos los materiales evaluados en el sustrato TMR disminuyeron la metanogénesis, pero solo SE, SM y PM mantuvieron inalterada la degradabilidad del sustrato cuando se usó la menor dosis. Con la mayor dosis, si bien disminuye el CH<sub>4</sub>, la degradabilidad del sustrato resulta comprometida. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Garcia *et al.* (2020), dado que cuando se incorporaron las dosis mayores de AE

de LT y TM se logró la disminución de CH<sub>4</sub>, pero la degradabilidad de los sustratos Pan y TMR resultó afectada de manera negativa. Estos compuestos incorporados en dosis altas generarían una mayor sensibilidad en las comunidades de bacterias fibrolíticas comparadas con otros microorganismos del rumen.

Para *L. turbinata*, la bibliografía referida a la composición de polifenoles que no se encuentren en los AE es escasa. Se detectaron en su composición principalmente fenoles, taninos y terpenos, reconociéndose también algunos flavonoides (Nuñez *et al.*, 2007; Fioravanti *et al.*, 2009), flavonas derivadas de apigenina y leucoantocianidinas (Pascual *et al.*, 2001; Araoz and Abdala, 2005). Por su parte, Aguado *et al.* (2016) hallaron que LT tiene capacidad antioxidante y mayor cantidad de FT cuando se lo compara con *Aloysia polystachya* G. (ambas de la familia *Verbenaceae*). Además, en el trabajo realizado por Hernández *et al.* (2000) donde probaron fracciones metanólicas de cinco plantas medicinales, LT fue la especie que presentó mayor actividad bactericida atribuida a la presencia de compuestos de la fracción TAN (Goleniowski *et al.*, 2006). Contrariamente, Wernert *et al.* (2009) detectaron una cantidad minoritaria de estos compuestos, reportando además una medida de FT mayor que la hallada en este trabajo (10,62 y 13,36 mg AT eq/g MS correspondiente a infusión y cocimiento, respectivamente vs 8,07 y 2,36 mg AT eq/g MS - PM y PAG). Sin embargo, los valores de TAN reportados por Wernert *et al.* (2009) no fueron tan dispares con este trabajo (1,60 y 1,98 mg AT eq/g MS infusión vs cocimiento; 5,30 y 1,48mg AT eq/g MS - PM y PAG).

Por otra parte, con respecto a *T. minuta*, Tereschuk *et al.* (1997) observaron actividad inhibitoria del crecimiento en bacterias Gram (+) y (-) usando extractos de sus hojas en agua y etil acetato, lo cual no coincide con Tian *et al.* (2009) respecto a las polaridades de los solventes y la capacidad antibacteriana. Los compuestos mayoritarios

hallados fueron dos flavonoides característicos de *Tagetes spp* (Al-Musayeib *et al.*, 2014), de los cuales solo uno presentó actividad antimicrobiana (Tereschuk *et al.*, 2004). Esta bioactividad podría deberse a la concentración de compuestos de la fracción TAN en cada solvente o a la composición fenólica en cada fracción (Tereschuk *et al.*, 1997; Tahir and Khan, 2012).

En retrospectiva, hubiera sido deseable tener un análisis más detallado de los componentes presentes en las fracciones fenólicas, dado que la mayoría de los compuestos de LT y TM que no pertenecen a los AE y que han presentado actividad antimicrobiana se encuentran dentro de la fracción TAN. Cuando se usan extractos la información obtenida sobre el efecto de cada constituyente fenólico sería válida solo como grupo (Bravo, 1998; Tedeschi *et al.*, 2021).

Los cambios en la producción de CH<sub>4</sub> no siempre conllevan variaciones similares en el número de protozoos, incluso cuando se asume una relación simbiótica entre estos y *archaeas* metanógenicas del rumen (Broudiscou *et al.*, 2000; Kim *et al.* 2012). Los resultados relativos a protozoos tanto para LT como TM van en la misma línea que lo reportado en el capítulo anterior. Así, solo en el sustrato TMR los protozoos resultaron afectados, disminuyendo significativamente su población cuando se incorporó MON.

Es bien sabido que la monensina causa una inhibición directa sobre las bacterias Gram (+) (Russell and Houlihan, 2003), lo que resulta en una disminución de la producción de CH<sub>4</sub> debido a la escasez de hidrógeno. Al mismo tiempo se estimula a las bacterias formadoras de Propiónico (Newbold *et al.*, 1993). En este trabajo, la inclusión de MON redujo la producción de gas total luego de 48 h de incubación en ambos sustratos, al igual que la producción de CH<sub>4</sub>. Estos resultados concuerdan con la literatura disponible sobre este ionóforo. Además, varios estudios han demostrado que la monensina inhibe de manera



significativa la producción de CH<sub>4</sub> en estudios *in vitro* (García-González *et al.*, 2008b; Medjekal *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2020).

A pesar de que existen varios estudios donde el pH no fue reportado (Kumar *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2015; Akanmu *et al.*, 2020) este es una variable señalada como posible predictora de la producción de CH<sub>4</sub> debido a que las *archaeas* metanogénicas son más sensibles a las variaciones de éste (Van Kessel *and* Russell, 1996). El rango considerado normal se encuentra entre 5,5 y 7 (Krause *and* Oetzel, 2006). Los resultados obtenidos en el siguiente trabajo muestran que el pH no se modificó de forma biológicamente significativa, lo cual es esperable en planteos *in vitro*. En este sentido, cuando los sustratos Pan y TMR fueron incubados *in vitro*, no se percibieron alteraciones en el pH que puedan relacionarse con la disminución en la producción de CH<sub>4</sub>.

La hipótesis de trabajo planteada se acepta parcialmente en primera instancia porque ambas especies evaluadas aumentaron la actividad antimicrobiana a medida que se incrementó su dosis de inclusión en el sustrato Pan. En el caso del sustrato TMR, el CH<sub>4</sub> se redujo en todos los tratamientos en todas las dosis. En segunda instancia, la hipótesis se acepta parcialmente porque en LT el rango de polifenoles detectado es menor y poco variable, mientras que en TM el comportamiento fue contrario.

### **3.6. Conclusión**

La adición de extractos y material vegetal de LT y TM a los sustratos Pan y TMR fue capaz de reducir la producción de metano durante la fermentación *in vitro*.

Las especies LT y TM mostraron diferencias en cuanto a la cantidad y composición de los compuestos fenólicos, siendo superiores para TM con respecto a LT. A pesar de ello, ambas especies mostraron bioactividad, sugiriendo que la misma no resulta de la presencia o ausencia de un compuesto en particular, sino de las características de fermentación

resultantes entre el sustrato y los compuestos fenólicos. Dentro de estos compuestos, algunos podrían repetirse entre los materiales probados, mientras que otros podrían aparecer como únicos o generar combinaciones diferenciales.

## **CAPÍTULO 4**

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DE *LIPPIA TURBINATA* Y *TAGETES MINUTA* MOLIDOS SOBRE LAS VARIABLES DE FERMENTACIÓN Y LAS POBLACIONES MICROBIANAS RUMINALES A TRAVÉS DEL TIEMPO.

### 4.1. Introducción

La comunidad microbiana ruminal está compuesta por bacterias, hongos, *archaeas* metanogénicas y protozoos, caracterizándose por una alta densidad y diversidad poblacional con múltiples interacciones. En el contenido ruminal algunos metabolitos producidos por ciertos microorganismos son utilizados como sustrato para el funcionamiento del metabolismo de otros. Por ejemplo, Kittelman *et al.* (2013) encontraron una correlación positiva entre bacterias y metanógenos, ya que representantes de las familias *Fibrobacteriaceae* y *Ruminococcaceae* producen formiato e H<sub>2</sub> que son utilizados como sustrato por los metanógenos. Las relaciones que se generan entre los microorganismos son la base de las variaciones en la formación de CH<sub>4</sub> (Kittelmann *et al.*, 2014).

Solo entre el 20% y el 60% de los microorganismos del rumen han sido identificados y caracterizados con métodos de cultivos convencionales y microscopía, debido a la dificultad de ser aislados en laboratorio (Sirohi *et al.*, 2012; Seshadri *et al.*, 2018). En particular, el crecimiento de las *archaeas* metanogénicas en cultivos *in vitro* es lento, con baja eficiencia y dificultad para mantenerlas libres de contaminantes (Leahy *et al.*, 2013). Por ello, no es posible alcanzar una detallada cuantificación de las poblaciones microbianas usando estas aproximaciones. Las técnicas moleculares facilitan la comprensión integrada de roles, funciones e interacciones entre las comunidades microbianas ruminales. Asimismo, el avance de la biología molecular permitió identificar y cuantificar de manera rápida y reproducible diferentes grupos microbianos presentes en el contenido ruminal (Sirohi *et al.*,

2012). En este sentido, la técnica de cuantificación de genes específicos o grupos microbianos conocida como PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es el método más usado en los últimos años (Kim *et al.*, 2017; Ortiz-Chura *et al.*, 2018; 2021).

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la bioactividad de los materiales vegetales previamente seleccionados sobre las poblaciones de *archaeas* metanogénicas, bacterias totales y protozoos en ensayos *in vitro*, examinando su dinámica a través del tiempo.

## **4.2. Hipótesis**

La adición del material vegetal de las especies LT y TM modifica la dinámica de la fermentación, generando cambios en las poblaciones de metanógenos, bacterias totales y protozoos del rumen a través del tiempo.

## **4.3. Materiales y Métodos**

### **4.3.1. Tratamientos**

Los tratamientos correspondieron al material vegetal molido de ambas especies (PM y SM). El proceso de obtención de los mismos se detalló en Materiales y Métodos del Capítulo 2.

### **4.3.2. Incubación *in vitro***

Se realizó un ensayo con la misma metodología mencionada en los capítulos 2 y 3, para valorar el material vegetal molido de LT y TM con base en el sustrato TMR. La composición química del sustrato se muestra en el Cuadro 21 del Anexo. Los cultivos *in vitro* se realizaron de igual manera que en los ensayos anteriores. Se usaron tres novillos Hereford con cánula ruminal ( $518 \pm 62$  kg) para obtener el FR para las incubaciones *in vitro*, alimentados con una dieta de heno de alfalfa y grano de maíz molido en una proporción 80:20

en base seca (Cuadro 23 del Anexo). El FR fue homogeneizado y filtrado dos veces a través de una doble capa de gasa en un matraz con agitador magnético mantenido a 39 °C en ambiente de anaerobiosis. El medio de cultivo consistió en 40 mL de una solución *buffer* carbonato-fosfato (Tilley *and* Terry, 1963) más 10 mL de FR. Para obtener los tratamientos correspondientes a la dosis de 1 g/L se incorporaron 50 mg de material molido en 450 mg de sustrato, excepto en el control donde el mismo alcanzó 500 mg. Además, se incluyó un blanco (FR más *buffer*, sin sustrato) usado para corrección de los datos de producción de gas y un control positivo con monensina (MON) a una concentración de 1,87 mg de monensina pura/L (Option 20%, Brascorp S.A., Buenos Aires, Argentina).

#### **4.3.3. Análisis químicos del material vegetal, variables de fermentación y parámetros bioquímicos**

El análisis químico del material vegetal y el sustrato se realizó de igual manera que las determinaciones de MS, MO, Cen, PB, FDN, FDA y DMS<sub>iv</sub> de la metodología descrita en el capítulo 2, al igual que la determinación de fenoles totales (FT), fenoles no tánicos (FNT) y taninos totales (TAN) mediante el método de Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003). Respecto a las variables de fermentación evaluadas, el volumen de gas, la producción de CH<sub>4</sub>, la degradabilidad *in vitro*, el contenido de nitrógeno amoniacal, el pH, el FP y la cantidad de protozoos se calcularon de igual manera que las metodologías descriptas en los capítulos 2 y 3.

#### **4.3.4. Extracción de ADN genómico**

El ADN genómico se extrajo a partir de 0,25 g de *pellet* proveniente de fermentación *in vitro* utilizando la técnica de RBB+C (*Repeated Bead Beating plus Column*) (Yu *and* Morrison, 2004) modificada. El ADN obtenido se analizó cuali y cuantitativamente mediante

electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), con *buffer* TAE 1X durante 30 min a 100 V y tinción con colorante GelRed (Biotium, Estados Unidos). La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El ADN obtenido y cuantificado se almacenó en freezer a -80 °C para su conservación hasta el momento de la amplificación mediante qPCR.

#### 4.3.5. Amplificación por qPCR

Se utilizó el ADN de un plásmido (PCR® 4-TOPOvector®, Invitrogen, Estados Unidos) que contiene el gen del ARNr 16S para poblaciones de bacterias totales y el gen de la metil coenzime-M reductasa (*mcrA*) para *archaeas* metanogénicas como estándares para las cuantificaciones de ambos grupos (Denman *and* McSweeney, 2006; Ortiz-Chura *et al.*, 2018; 2021).

Para estimar los cambios poblacionales se usaron cebadores específicos (Cuadro 12), en muestras tomadas en cuatro tiempos distintos a lo largo del ensayo de fermentación (0, 12, 24 y 48 h). La qPCR se realizó utilizando el termociclador ABI 7500 v2.3 (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) con un sistema de detección de secuencias. Se agregaron 2 µL de templado de ADN (10 ng/µL) a la reacción de amplificación con 20 pmol de cada cebador, 4 µL de 5 × FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia) y agua libre de ADN/ARN ajustada a un volumen total de 20 µL. Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de 95 °C por 15 min para la desnaturalización del ADN molde, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, la hibridación a 60 °C por 30 seg y la elongación a 72 °C por 1 min durante 30 ciclos y finalmente un paso de extensión a 72 °C por 10 min (Denman *et al.*, 2007).

La especificidad del amplicón se verificó de acuerdo con la curva de disociación del producto de PCR final, aumentando la temperatura 1 °C cada 30 seg desde 60 °C hasta 95 °C.

La precisión de la cuantificación microbiana mediante qPCR se basó en curvas estándares preparadas con concentraciones ya conocidas del plásmido para el objetivo respectivo y los valores de eficiencia de amplificación por PCR. En cada reacción, los valores de regresión lineal de la curva estándar se deberán encontrar dentro de los límites normales ( $R^2 = 0,99$ ; pendiente = -3,2 a -3,6; eficiencia = 100–110%) (Zhang *and* Fang, 2006). Estos valores se utilizaron para estimar el número de copias de los genes ARNr 16S de cada muestra. Para este análisis se utilizó la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ copias / g rumen} = (Q \times C) / V$$

donde: Q = es la media de las copias; C = concentración total de ADN en cada muestra (ng / g) y V = es la concentración de ADN utilizada en la reacción (ng).

**Cuadro 12:** Especificaciones de cebadores para bacterias y *archaeas* metanogénicas totales.

Especie blanco	Cebadores (5'-3')	Hibridación (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>archaeas</i> metanogénicas totales ( <i>mcrA</i> )	F: TTC GGT GGA TCD CAR AGR GC R: GBA RGT CGW AWC CGT AGA ATC C	60	140	Denman <i>et al.</i> , 2007
Bacterias totales (16S rARN)	F: CGG CAA CGAGCG CGA ACC C R: CCA TTG TAGCAC GTG TGT AGCC	60	130	Denman <i>and</i> McSweeney, 2006



#### 4.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas biológicas discontinuas en el tiempo (corridas) y en cada una de ellas cinco réplicas técnicas (botellas) en las cuales se midió producción de gas. De ellas, dos fueron usadas para medición de CH<sub>4</sub> y degradabilidad, dos para extracción de ADN y una para determinar pH, protozoos y N-NH<sub>3</sub> en los cuatro tiempos (0, 12, 24 y 48 h). Los efectos fijos fueron los materiales vegetales evaluados, la MON y la dosis de inclusión, mientras que cada réplica biológica o corrida fue considerada efecto aleatorio. Los datos se analizaron con modelos lineales generalizados mixtos utilizando el software R 3.6.2. El efecto de cada inclusión (material vegetal) sobre los parámetros de fermentación (diferencia del control), fue expresado como incremento o disminución (porcentaje) respecto del valor del control por cada horario por separado. Se utilizó el *test* de *Dunnnett* para comparar las medias (García-González *et al.*, 2008a). La significancia se declaró cuando  $p \leq 0,05$  y las tendencias fueron discutidas cuando  $p \leq 0,10$ .

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij},$$

$Y_{ij}$  fue la observación,  $\mu$  fue la media general para cada parámetro,  $\tau_i$  fue el efecto del tratamiento ( $i = 1, \dots, 6$ ),  $\beta_j$  fue el efecto de run ( $j = 1, 2, 3$ ) y  $\varepsilon_{ij}$  fue el error residual.

### 4.4. Resultados

#### 4.4.1. Producción de gas, concentración de metano y degradabilidad *in vitro* del sustrato

Como se observa en el Cuadro 13, a la hora 12, 24 y 48 la PGMS disminuyó con los tratamientos con respecto a la D0 ( $p < 0,001$ ). En la hora 12 la reducción varió entre 10,5% y 18,5%, a la hora 24 varió entre 12,7% y 18,1%, mientras que a la hora 48 fluctuó entre 12,3% y 17,4%. En todos los casos, el menor porcentaje corresponde a MON y el mayor a PM1. De

igual modo, la PGMO resultó significativamente afectada por todos los tratamientos en todos los horarios, donde la mayor reducción se obtuvo con el tratamiento PM1 (18; 17,7 y 16,9% respectivamente) y el menor con MON (10,5; 12,7 y 12,3% respectivamente).

**Cuadro 13:** Efecto de la inclusión de material vegetal de LT y TM sobre la producción de gas, metano y la degradabilidad del sustrato TMR a la hora 12, 24 y 48 en relación a la D0.

Variables	D0	MON	SM1	PM1	EE	<i>p</i> -valor ANAVA
<b>Hora 12</b>						
PGMS (mL/gMSi)	137,95	123,48***	114,62***	112,45***	1,087	<0,0001
PGMO (mL/gMOi)	146,36	131,01***	122,07***	119,97***	1,153	<0,0001
%CH <sub>4</sub>	1,98	1,73***	1,83*	1,85	0,061	0,0074
MMSi (mL/gMSi)	2,71	2,13***	2,12***	2,08***	0,125	0,0002
MMOi (mL/gMOi)	2,88	2,26***	2,25***	2,22***	0,132	0,0002
MFDNi (mL/gFDNi)	8,71	6,84***	6,11***	5,87***	0,379	<0,0001
MS d (g d/g inc)	0,76	0,74***	0,72***	0,73***	0,003	<0,0001
MO d (g d/g inc)	0,73	0,72***	0,70***	0,71***	0,003	<0,0001
FDN d (g d/g inc)	0,17	0,12***	0,15*	0,19*	0,009	<0,0001
<b>Hora 24</b>						
PGMS (mL/gMSi)	204,82	178,82***	170,64***	167,70***	3,984	<0,0001
PGMO (mL/gMOi)	217,31	189,72***	182,34***	178,87***	2,710	<0,0001
%CH <sub>4</sub>	2,81	2,25***	2,70	2,56*	0,088	0,0001
MMSi (mL/gMSi)	5,79	4,05***	4,65***	4,24***	0,245	<0,0001
MMOi (mL/gMOi)	6,15	4,29***	4,96***	4,56***	0,260	<0,0001
MFDNi (mL/gFDNi)	18,59	12,98***	13,38***	12,06***	0,789	<0,0001
MS d (g d/g inc)	0,83	0,78***	0,78***	0,78***	0,003	<0,0001
MO d (g d/g inc)	0,81	0,76***	0,76***	0,76***	0,003	<0,0001
FDN d (g d/g inc)	0,40	0,25***	0,33***	0,33***	0,010	<0,0001
<b>Hora 48</b>						
PGMS (mL/gMSi)	244,37	214,41***	204,53***	201,88***	11,590	<0,0001
PGMO (mL/gMOi)	259,26	227,48***	217,28***	215,38***	2,636	<0,0001
%CH <sub>4</sub>	3,25	2,53***	3,09	3,13	0,099	<0,0001
MMSi (mL/gMSi)	8,03	5,41***	6,35***	6,32***	0,235	<0,0001
MMOi (mL/gMOi)	8,52	5,74***	6,74***	6,74***	0,250	<0,0001

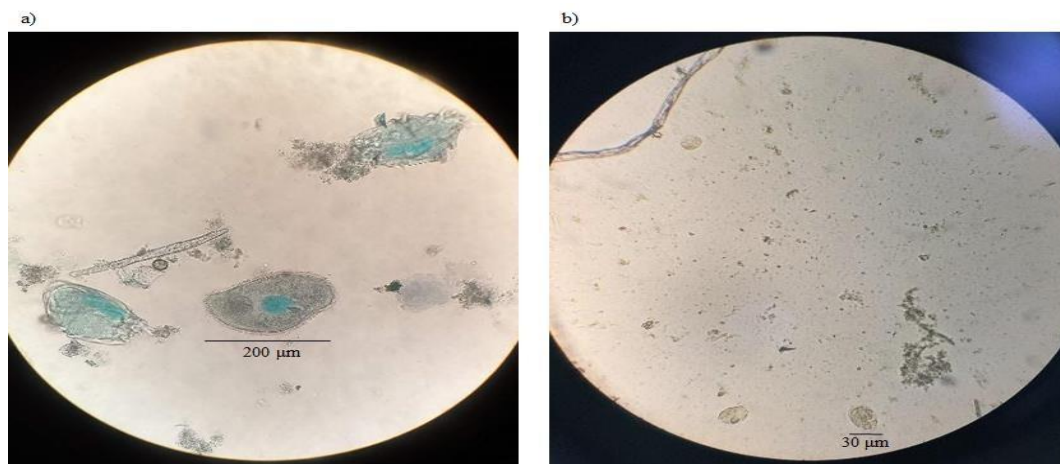
<b>MFDNi (mL/gFDNi)</b>	25,78	17,38***	18,28***	17,85***	0,748	<0,0001
<b>MS d (g d/g inc)</b>	0,86	0,85***	0,81***	0,81***	0,004	<0,0001
<b>MO d (g d/g inc)</b>	0,85	0,83***	0,80***	0,80***	0,004	<0,0001
<b>FDN d (g d/g inc)</b>	0,51	0,46***	0,44***	0,44***	0,010	<0,0001

D0: dosis cero; MON: monensina; SM1: suico molido 1 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.

En cuanto a la producción de %CH<sub>4</sub>, la reducción que produjo MON osciló entre 12,6; 19,9 y 22,1% ( $p < 0,001$ ) respecto a D0. SM1 causó una reducción significativa solo a la hora 12 (7,6%) y PM1 lo hizo a la hora 24 (8,9%). Respecto a la producción de mL de CH<sub>4</sub> en función de los gramos de MS, MO y FDN incubada, todos los tratamientos redujeron las emisiones en todos los horarios ( $p < 0,0001$ ). Las menores reducciones en relación con la MS incubada se obtuvieron con SM1 (21,8; 19,7 y 20,9% en los respectivos horarios), mientras que MON produjo las mayores reducciones en los horarios 24 y 48 (30 y 32% respectivamente). Con respecto a la producción de CH<sub>4</sub> en función a la MO incubada, el tratamiento MON mostró las mayores reducciones en los 3 horarios (21,5; 30,1 y 32,6% respectivamente). Con PM1 en los horarios 12 y 24 se obtuvo una mayor reducción comparado con SM1, pero al horario 48, ambos alcanzaron el mismo nivel de reducción (20,9%). En cuanto a los mL de CH<sub>4</sub> relacionados con la FDNi, el tratamiento PM1 fue el que logró la reducción mayor en los tres horarios, variando de 32,6; 35,1 a 30,8%, respectivamente. SM1 redujo más la emisión de CH<sub>4</sub> en la hora 12 comparado con MON, pero a las 24 y 48 h lo superó. La degradabilidad de la MS, la MO y la FDN fueron negativamente afectadas por todos los tratamientos en todos los tiempos ( $p < 0,0001$ ), excepto por el tratamiento PM1 en el horario 12, que aumentó un 14,4% la degradabilidad de la fibra.

#### 4.4.2. Parámetros bioquímicos de la fermentación *in vitro*

El pH no se vio afectado de manera biológicamente significativa (Cuadro 14). A manera de ejemplo en la Figura 11 se observan los protozoos del género *Isotrichia* y *Entodinomorfos* pertenecientes a muestras de los tratamientos D0 y MON a la hora 48. El tratamiento MON fue el único que disminuyó la cantidad de protozoos de manera significativa al horario 48 respecto al control (61%;  $p < 0,001$ ). El contenido de N-NH<sub>3</sub> no resultó afectado en los horarios 12 y 24 ( $p = 0,4737$  y  $p = 0,3635$ , respectivamente), mientras que en el horario 48 el tratamiento MON resultó significativo ( $p < 0,001$ ) disminuyendo en 14% la cantidad de N-NH<sub>3</sub> con respecto a D0. En cuanto al FP, este resultó afectado en todos los horarios ( $p < 0,0001$ ), siendo más elevado en todos los tratamientos respecto a la D0.



**Figura 11:** Protozoos ciliados observados en microscopio. a) *Isotrichia* y *Entodimorfos* en D0 a las 48 h; b) *Entodinium* en MON a las 48 h.

**Cuadro 14:** Efecto de la inclusión de material vegetal de LT y TM sobre el pH, protozoos, contenido de nitrógeno amoniacal y el factor de partición en el sustrato TMR a la hora 12, 24 y 48 en relación a la D0.

Variables	D0	MON	SM1	PM1	EE	p-valor ANAVA
<b>Hora 12</b>						
pH	6,73	6,73	6,75	6,78	0,021	0,1603
Protozoos (N°x 10 <sup>-3</sup> /mL)	13,97	9,25	12,56	8,90	2,211	0,1529
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	14,92	14,10	14,49	14,69	0,531	0,4737
FP (mg MS d/mL gas)	5,93	6,42***	6,75***	6,88***	0,122	<0,0001
<b>Hora 24</b>						
pH	6,73	6,70	6,74	6,74	0,020	0,2137
Protozoos (N°x 10 <sup>-3</sup> /mL)	11,22	5,56	5,45	5,16	4,401	0,5039
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	18,77	17,73	17,86	17,58	0,715	0,3635
FP (mg MS d/mL gas)	4,09	4,52***	4,65***	4,74***	0,074	<0,0001
<b>Hora 48</b>						
pH	6,72	6,69	6,74	6,75	0,013	0,0167
Protozoos (N°x 10 <sup>-3</sup> /mL)	9,27	3,61***	11,33	9,76	1,185	0,0028
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	24,37	20,96***	22,99	24,36	0,786	0,001
FP (mg MS d/mL gas)	3,51	3,97***	3,95**	4,04***	0,058	<0,0001

D0: dosis cero; MON: monensina; SM1: suico molido 1 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.

#### 4.4.3. Cuantificación de las poblaciones de bacterias y metanógenos totales

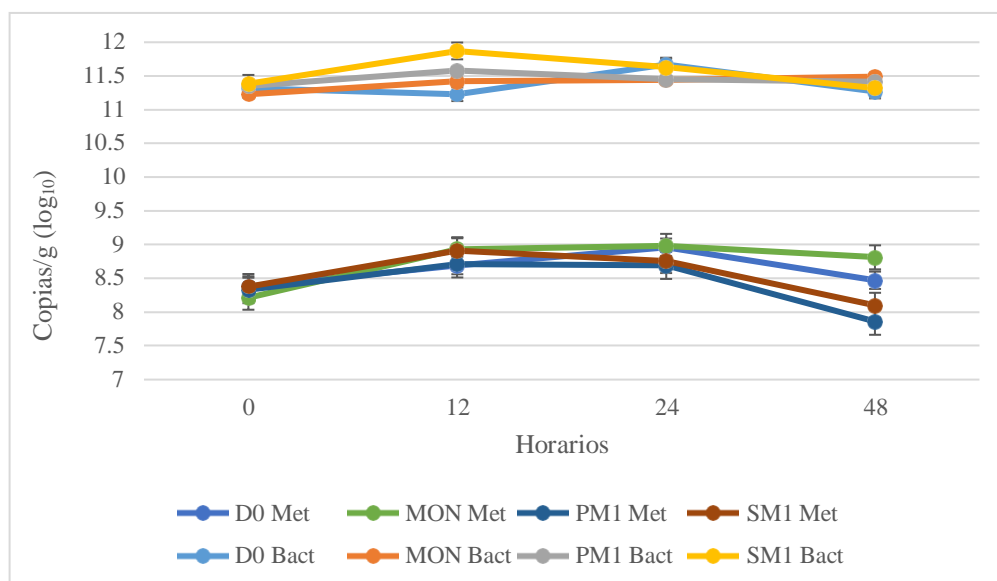
Las poblaciones de bacterias totales (copias/g) se mostraron afectadas solo en los horarios 12 y 48 ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 15). A la hora 12, SM1 aumentó en 5,7% la población respecto a la D0 ( $p < 0,001$ ), mientras que a la hora 48 este efecto se consiguió con los tratamientos MON ( $p < 0,001$ ; 2,2%) y PM1 ( $p = 0,028$ ; 1,2%). Con respecto a las poblaciones de *archaeas* metanogénicas, también resultaron afectadas a las 12 horas de incubación ( $p = 0,0208$ ). Si bien todos los tratamientos aumentaron la cantidad de metanógenos, solo MON lo hizo de manera significativa ( $p = 0,0172$ ). Por su parte, en los horarios 24 y 48 el único tratamiento significativo fue PM1, que redujo la población de metanógenos en 2,9%

( $p=0,047$ ) y 7,2% ( $p=0,025$ ) respectivamente. En la Figura 12 se observa la variación de las poblaciones bacterianas y de *archaeas* metanogénicas evaluadas a lo largo del tiempo.

**Cuadro 15:** Efecto de la inclusión de material vegetal de LT y TM sobre las poblaciones de bacterias totales y metanógenos totales a la hora 0, 12, 24 y 48 (valores expresados en  $\log_{10}$ ) en relación a la D0.

Población	D0	MON	SM1	PM1	EE	<i>p</i> -valor ANAVA
<b>Hora 0</b>						
Bacterias totales (copias/g)	11,32	11,23	11,39	11,35	0,085	0,2408
Metanógenos (copias/g)	8,38	8,21	8,38	8,33	0,132	0,3102
<b>Hora 12</b>						
Bacterias totales (copias/g)	11,23	11,42	11,87***	11,58	0,162	0,0084
Metanógenos (copias/g)	8,69	8,93*	8,90	8,71	0,100	0,0208
<b>Hora 24</b>						
Bacterias totales (copias/g)	11,67	11,03	11,63	11,45	0,438	0,3756
Metanógenos (copias/g)	8,95	8,98	8,76	8,69*	0,129	0,0491
<b>Hora 48</b>						
Bacterias totales (copias/g)	11,27	11,49***	11,32	11,41*	0,058	0,0051
Metanógenos (copias/g)	8,47	8,81	8,09	7,86*	0,233	0,0022

D0: dosis cero; MON: monensina; SM1: suico molido 1 g/L; PM1: poleo molido 1 g/L. Significancia: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . La significancia corresponde a la comparación de cada tratamiento respecto a la D0.



**Figura 12:** Comparación de bacterias totales y *archaeas* metanogénicas a la hora 0, 12, 24 y 48 con los tratamientos D0 (Dosis 0), MON (monensina), SM1 (suico molido 1 g/L) y PM1 (poleo molido 1 g/L).

#### 4.5. Discusión

Comprender cómo los microorganismos ruminales son afectados por nuevos aditivos y las interacciones que se generan entre ellos y el animal huésped, brinda información valiosa para el desarrollo de nuevos sistemas de producción.

En los capítulos anteriores se concluyó sobre el contenido de compuestos fenólicos y modo de acción diferencial que presentan las especies vegetales LT y TM sobre la fermentación ruminal. Además, también se concluyó sobre la permanencia de compuestos bioactivos luego de que el material vegetal es tratado con solventes de diferentes polaridades, así como acerca de la dependencia de las respuestas al tipo de sustrato.

En coincidencia con los resultados obtenidos en el capítulo 3, la inclusión del material vegetal molido de LT y TM disminuyó la producción de gas, la producción de CH<sub>4</sub> en relación con el sustrato incubado y la degradabilidad ruminal. Esto fue evidente desde las primeras horas de incubación, sugiriendo que la acción biológica de los compuestos sobre el

ambiente ruminal *in vitro* es rápida. Si bien esto era esperable y ha sido demostrado en el caso de otros aditivos (Colombatto *et al.*, 2003), hasta donde se pudo indagar, este es el primer reporte que describe la dinámica de fermentación de LT y TM sobre el ambiente ruminal *in vitro*. Como ya fuera mencionado, la reducción en la producción de gas y en particular CH<sub>4</sub>, se atribuye a un efecto directo de los compuestos fenólicos (más en su aspecto cualitativo que cuantitativo) sobre *archaeas* metanogénicas. Sin embargo, esto sólo se observa en el caso de LT, en donde la población de estos microorganismos disminuye, al contrario de lo que ocurre con TM.

De esta manera, se podría sugerir que la disminución en las emisiones de CH<sub>4</sub> con LT estuvo mediada por la reducción de las poblaciones de *archaeas* metanogénicas. Un contraargumento podría ser que la menor degradabilidad de las fracciones digestibles del sustrato, estadísticamente significativa en este ensayo, pero no en el anterior, podría explicar esta reducción en CH<sub>4</sub>. Sin embargo, TM redujo la degradabilidad del sustrato con la misma intensidad que LT, sin modificar la población de *archaeas* metanogénicas. Colectivamente, esto implicaría la confirmación de que el modo de acción de ambas especies evaluadas es diferente. No obstante, el hecho de haber hallado una menor cantidad de producción de CH<sub>4</sub> acompañada de una reducción en el número de *archaeas* metanogénicas, no implicaría necesariamente una relación causal. En efecto, Witzig *et al.* (2018) y Broudiscou *et al.* (2000) reportan que es posible que se reduzca la producción de CH<sub>4</sub> sin alterar el tamaño de la población de *archaeas* metanogénicas, como se registró con la incorporación de TM. Por su parte, Banik *et al.* (2016) hallaron un efecto biostático de ciertas *archaeas* metanogénicas sin modificar el tamaño de la población. Por el contrario, para el tratamiento LT, la reducción fue en ambos parámetros en concordancia con lo reportado con Tan *et al.* (2011).



Estas aparentes inconsistencias entre el tamaño de las poblaciones y la cantidad de producto final de fermentación, reafirmarían el concepto de resiliencia del ecosistema ruminal. Ante la inclusión de un aditivo que genera inhibición sobre alguna población en particular, esta deja lugar a que otras poblaciones ocupen ese nicho (Henderson *et al.*, 2015; Beauchemin *et al.*, 2020). En efecto, Banik *et al.* (2016) discutieron estos aspectos, sugiriendo que el desarrollo de aditivos que propenden al mantenimiento de las poblaciones de microorganismos en niveles basales bajos, sería más beneficioso que la búsqueda de aquellos que las eliminen directamente. De esta manera se retrasaría la aparición de células microbianas con resistencia a esos compuestos (Moss *et al.*, 2000).

En el caso de las bacterias totales, colectivamente los cambios no fueron de relevancia biológica, y los aumentos observados con SM a la hora 12 y PM a la hora 48 no se correspondieron con un aumento en ninguno de los parámetros de la fermentación.

Las variables del ambiente ruminal siguieron el mismo patrón de los parámetros de degradación en una coincidencia tanto cuantitativa como cualitativa (términos relativos) con los resultados reportados en el capítulo anterior. Esto refuerza la idea de la repetibilidad de los ensayos *in vitro* para evaluar estos parámetros (Yañez-Ruiz *et al.*, 2016). En cuanto a los organismos protozoarios, solo MON logró reducir de manera significativa su población, mientras que tanto LT como TM la mantuvieron inalterada. Tal como se mencionó en capítulos anteriores, la idea de establecer una relación causa-efecto respecto a la producción de gas y la relación entre los protozoos con las *archaeas* metanógenicas resulta compleja, ya que existen inconsistencias entre reportes científicos (Patra *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

En términos relativos, el grado de disminución en las variables estudiadas fue similar entre ambos experimentos, con la excepción de la significancia estadística mencionada más arriba. Esto podría quizás ser atribuido a la menor variabilidad de un ensayo con respecto al otro, diferentes momentos en el tiempo, calidad del FR, etc (García-González *et al.*, 2008b, Yañez-Ruiz *et al.*, 2016).

A modo de corolario, la hipótesis de trabajo se acepta parcialmente en lo que concierne a los cambios en la dinámica de fermentación y en las poblaciones de *archaeas* metanogénicas. No obstante, no se observaron efectos sobre las bacterias y los protozoarios por parte de la inclusión de LT y TM.

#### **4.6. Conclusión**

De acuerdo con mi leal saber y entender, este es el primer trabajo donde se evalúa la dinámica de fermentación y las poblaciones microbianas del rumen a través del tiempo, afectadas por la inclusión de LT y TM.

Se confirma la repetibilidad de los resultados de los ensayos *in vitro*, lo cual resulta de suma utilidad para la evaluación de compuestos bioactivos que puedan modificar los patrones de fermentación ruminal.

Tanto LT como TM muestran efectividad en la alteración de la dinámica de fermentación, pero con modos de acción diferenciales. Mientras LT reduce la producción de CH<sub>4</sub> y concomitantemente las poblaciones de *archaeas* metanogénicas, TM disminuye el CH<sub>4</sub> sin afectar a estos microorganismos. No fue posible establecer una relación directa entre la reducción en el número de *archaeas* metanogénicas con la población de protozoarios.

Se deberían planificar futuros estudios enfocados en definir cuáles serían los compuestos presentes en las fracciones bioactivas de estos materiales, que resultan

responsables de la disminución de la producción de CH<sub>4</sub> y/o las poblaciones de *archaeas* metanogénicas. Este paso sería necesario para precisar el modo de acción de LT y TM.

## **CAPÍTULO 5**

## **DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES**

En los últimos años, ha habido un creciente interés por parte de investigadores en América Latina con respecto a la búsqueda de alternativas en estrategias de mitigación de la metanogénesis ruminal. El abordaje de la situación es amplio debido a la cantidad de productos disponibles y las numerosas inconsistencias halladas en cuanto a los resultados. Nuestro grupo de trabajo ha examinado un gran número de AE de plantas medicinales que crecen en las Sierras de Córdoba, logrando seleccionar las especies *Lippia turbinara* (LT) y *Tagetes minuta* (TM) por su potencial de disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub> ruminal en ensayos *in vitro*. Dado que muchos aspectos del uso de estos compuestos y su modo de acción permanecen aun parcialmente desconocidos, resulta difícil garantizar que constituyan una estrategia de mitigación de la producción de CH<sub>4</sub> en rumiantes en un futuro inmediato.

En el presente trabajo, la selección de las especies LT y TM se basó en sus efectos antimicrobianos o digestivos previamente reportados por los AE, con el objeto de determinar si existía bioactividad más allá de los componentes volátiles presentes en los mismos. Existen pocos trabajos donde se refiera al tema de extractos o compuestos bioactivos que sean diferentes a AE, saponinas, taninos y extractos líquidos, encontrando aquí un vacío de conocimiento. Con el objeto de ampliar y complementar el enfoque de la línea de trabajo, en esta tesis se abordó el estudio de otros compuestos bioactivos con potencial para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub> diferentes a los AE. Para ello, los compuestos volátiles se eliminaron mediante solventes de polaridades diversas y se obtuvieron diferentes fracciones que fueron el objeto de estudio en esta tesis.

Los trabajos experimentales realizados con la inclusión de estos materiales vegetales y su perfil de compuestos fenólicos sobre la fermentación microbiana ruminal en sistemas *in vitro* permiten concluir:

Al incorporar tanto el material vegetal como los extractos resultantes de los tratamientos PAL1 y SE1, se lograron reducciones significativas en las emisiones de CH<sub>4</sub>. Por lo que se comprobó la existencia de bioactividad aun cuando aquellos compuestos volátiles pertenecientes a los AE fueron eliminados mediante diversos solventes. La degradabilidad del sustrato *in vitro* no resultó comprometida con la inclusión de PAL1, lo cual indica que no hubo efectos perjudiciales sobre los microorganismos ruminales, incluyendo a los protozoarios. Por otro lado, cuando se incorporó el tratamiento SE1, a pesar de que se evidenció una potente acción antimetanogénica, la degradabilidad del sustrato fue menor.

Las vías de acción de los compuestos presentes en LT y TM dependen del perfil de compuestos fenólicos y las relaciones generadas entre los sustratos. Ambas especies presentan diferencias en cuanto a la cantidad y composición de los compuestos fenólicos, siendo superiores para TM con respecto a LT en cualquier tipo de presentación (material molido y extractos). Estos hallazgos sugieren que su bioactividad no resulta de la presencia o ausencia de un compuesto fenólico en particular, sino de la relación obtenida entre estos y el sustrato. Los compuestos fenólicos en cada tratamiento pueden ser los mismos, como así también únicos o combinarse de manera diferencial.

Se comprobó que la acción biológica de los compuestos sobre el ambiente ruminal en sistemas *in vitro* se produce a partir de las primeras horas de incubación. Se remarca que

este trabajo es el primero donde se evalúa la dinámica de fermentación y las poblaciones microbianas ruminales a través del tiempo, en respuesta a la inclusión de compuestos bioactivos de LT y TM. Asimismo, este trabajo mostró que el modo de acción de las especies vegetales evaluadas es diferencial: mientras que por un lado las emisiones de CH<sub>4</sub> con LT estuvo mediada por la reducción de las poblaciones de *archaeas* metanogénicas, por otro lado, la inclusión de TM redujo la degradabilidad del sustrato en igual grado que LT, sin alterar la población de estos microorganismos. Se podría justificar la reducción en la producción de gas y en particular de CH<sub>4</sub>, a un efecto directo del tipo de compuestos fenólicos, más que de su cantidad.

Con base en los resultados obtenidos, no sería posible afirmar que existe una relación directa entre la reducción en el número de *archaeas* metanogénicas y la población de protozoarios, como así tampoco una disminución de CH<sub>4</sub> ligada a la reducción en el número de *archaeas* metanogénicas.

La verificación en la repetibilidad de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, permite remarcar la utilidad de los mismos en la evaluación de compuestos bioactivos modificadores de la fermentación ruminal. Probablemente, la contrapartida de este tipo de experimentos es el espacio limitado del incubador y la cantidad de muestras que se pueden evaluar en simultáneo. Lo precedente sugiere que se requiere de una buena planificación en el diseño experimental, que asegure tener el número de réplicas biológicas necesarias para encontrar diferencias significativas.

Basándome en lo expuesto anteriormente, describo las siguientes recomendaciones para futuros trabajos de investigación en esta temática:

▪ La efectividad de los compuestos bioactivos varía a causa de muchos factores, por lo que para su identificación y efectividad se proponen las siguientes etapas de acuerdo a lo que sugieren Flachowsky *and* Lebzien, (2012). Estas son: a) caracterización botánica; b) caracterización analítica de los compuestos presentes; c) estudios *in vitro* para evaluar los efectos en la fermentación y la producción de CH<sub>4</sub>; d) estudios *in vivo* para evaluar los efectos en el consumo, en la digestibilidad, en el desempeño animal y en la emisión de CH<sub>4</sub>. Con respecto al punto (a), en la mayoría de los trabajos citados, el material utilizado se consiguió en mercados locales o no se especificó ni el lugar de recolección, ni la época del año (estado fenológico de las plantas). La caracterización botánica permitiría trabajar con mayor certeza con respecto a las especies vegetales usadas en los experimentos. De lo contrario, su omisión podría conducir a resultados no repetibles si el material vegetal no está correctamente identificado. En la etapa siguiente (b) muchas veces no es posible alcanzar una caracterización analítica detallada de los compuestos, ya sea por falta de equipamientos necesarios, por altos costos o por falta de técnicas disponibles. Una solución accesible a esto, sería realizar caracterizaciones de grandes grupos químicos mediante técnicas colorimétricas, por ejemplo, resulta más barato y rápido. Además, se obtiene información valiosa para complementar con los ensayos *in vitro*. Concentrar esfuerzos y dinero en tratar de llegar a un principio activo muchas veces no es posible, o el principio activo por sí solo no rinde los resultados esperados. Además, si para poder conseguir estos compuestos se utilizan técnicas complejas y costosas, sería una opción inviable para que los consumidores (productores ganaderos) la adopten. Siguiendo los pasos sugeridos, lo óptimo sería seguir las etapas c y d en la secuencia correcta. No obstante, antes de validar los resultados en un ensayo *in vivo* (etapa d), se recomienda efectuar un estudio de confirmación de los resultados *in vitro*, para



corroborar que estos no hayan sido afectados por factores externos (Bodas *et al.*, 2008; García-González *et al.*, 2008b).

- Sería importante unificar los criterios a la hora de referirse a compuestos bioactivos, fitoquímicos, metabolitos secundarios y extractos. Hallar información con respecto a este tema es complejo, ya que no hay una sola manera de llamarlos. Para algunos autores, los compuestos bioactivos o metabolitos secundarios corresponden a grandes grupos químicos que forman parte del metabolismo de los vegetales, presentes en bajas concentraciones, variando sus niveles según especie, tiempo y espacio. En el caso de los extractos, estos resultan del tratamiento del material vegetal con algún tipo de solvente.

- Realizar un control de calidad y trazabilidad del material seleccionado tanto cuando se lo recolecta, como cuando se lo utiliza en los ensayos. Los compuestos fenólicos en particular se degradan con la luz, por lo que realizar una cuantificación de las fracciones fenólicas antes de utilizarlo (luego de su almacenamiento) sería de utilidad. Asimismo, las condiciones de almacenamiento son importantes al momento de garantizar la integridad de aquellos.

- Asegurar que los compuestos bioactivos presenten total inocuidad para los animales, los consumidores y el medio ambiente. En este sentido, es necesario comprobar que estos no afecten negativamente a la calidad de los productos derivados. Algunos presentan efectos adversos para el animal o para la microbiota ruminal, reduciendo la digestión y el consumo.

- A futuro propongo realizar un ensayo donde se puedan combinar los materiales molidos en diferentes dosis y combinación de sus maneras de acción. Para complementar el trabajo realizado, aumentaría el número de marcadores moleculares discriminantes tanto para poblaciones bacterianas, como para *archaeas* metanogénicas y protozoarios en forrajes de

baja calidad y en el sustrato TMR utilizado. Así, el sustrato altamente fibroso representa sistemas de producción de cría, donde la incorporación de aditivos que reducen la emisión de CH<sub>4</sub> produciría un impacto marginal mayor al encontrado en TMR, sin afectar la degradabilidad de la fibra. A su vez, examinaría las *archaeas* metanogénicas en cultivos de especies puras o en combinaciones de ellas.

- Dado que los ensayos *in vitro* requieren la aplicación de diseños experimentales adecuados, una opción sería limitar el número de tratamientos experimentales a evaluar para garantizar una cantidad de réplicas confiable.
- La incorporación de aditivos sólidos como material vegetal o fracciones obtenidas mediante la extracción con solventes, en las dietas de animales, sería una estrategia adoptada rápidamente por los productores. Dado que esta incorporación resultaría en una mezcla homogénea al momento de la preparación de la ración, asegurando que todos los animales reciban el aditivo en una dosis efectiva.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C., & Kamra, D. N. 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2-4), 321-327.
- Aguado, M. I., Dudik, N., Pérez Zamora, C. M., Torres, C. A., & Nuñez, M. B. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of hydroalcoholic extracts from *Aloysia polystachya* griseb moldenke and *Lippia turbinata* griseb (Verbenaceae).
- Akanmu, A. M., Hassen, A., & Adejoro, F. A. 2020. Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. *Animals*, 10(1), 146.
- Akin, D. E., & Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), 1117-1125.
- Akin, D. E., Ames-Gottfred, N., Hartley, R. D., Fulcher, R. G., & Rigsby, L. L. 1990. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. *Crop Science*, 30(2), 396-401.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Al-Musayeib, N. M., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R., & Ross, S. A. 2014. New thiophene and flavonoid from *Tagetes minuta* leaves growing in Saudi Arabia. *Molecules*, 19(3), 2819-2828.
- Alonso, J. R. 2004. *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. Rosario (Argentina): Ed. Corpus. ISBN: 987-20292-3-7
- Alonso, J. R. 1998. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas* (pp. 990-991). Buenos Aires: Isis.
- AOAC.1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. Vol. I 15° Ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Araoz, M. V. C., & Abdala, L. R. 2005. Caracterización preliminar de los flavonoides mayoritarios de *Lippia turbinata* Griseb. en una muestra recogida en Vipos (Argentina). *acta farmacéutica bonaerense*, 24(4), 546-9.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., & Gäbel, G. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of animal science*, 89(4), 1092-1107.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Banik, B. K., Durmic, Z., Erskine, W., Revell, C. K., Vadhanabhuti, J., McSweeney, C. S., ... & Vercoe, P. E. 2016. Bioactive fractions from the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. have an anti-methanogenic effect against key rumen methanogens. *Anaerobe*, 39, 173-182.
- 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. *Journal of theoretical biology*, 238(1), 36-51.
- Barry, T. N., & McNabb, W. C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 263-272.
- Basarab, J. A., Beauchemin, K. A., Baron, V. S., Ominski, K. H., Guan, L. L., Miller, S. P., & Crowley, J. J. 2013. Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal*, 7(s2), 303-315.
- Basso, L. R. 2013. Agricultura Inteligente: la iniciativa de la Argentina para la sustentabilidad en la producción de alimentos y energía.
- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., & Yang, W. Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, 81(14\_suppl\_2), E37-E47.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'mara, F., & McAllister, T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 21-27.
- Beauchemin, K. A., Ungerfeld, E. M., Eckard, R. J., & Wang, M. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 14(S1), s2-s16.
- Beg, A. Z., & Ahmad, I. 2000. Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(8), 841-844.
- Benaouda, M., González Ronquillo, M., Molina, L. T., & Castelán Ortega, O. A. 2017. Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de mitigación en América Latina. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 965-974.
- Benaouda, M., González Ronquillo, M., Molina, L. T., & Castelán Ortega, O. A. 2017. Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de

- mitigación en América Latina. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 965-974.
- Berger, L. M., Wein, S., Blank, R., Metges, C. C., & Wolfram, S. 2012. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5047-5055.
- Bertrand, S., & Hacala, S. 2007. Generation and Sources of Greenhouse Gases in the Dairy Industry. *Fil-Idf Bulletin: Federation Internationale de Laiterie International Dairy Federation*, (422), 10.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., & Prasad, C. S. 2014. Effects of graded levels of tannin containing tropical leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., ... & Kurihara, M. 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), 5512-5522.
- Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 77(1-5), 24-34.
- Bodas, R., López, S., Fernandez, M., García-González, R., Rodríguez, A. B., Wallace, R. J., & González, J. S. 2008. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 245-258.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 78-93.
- Bonin, A. S., & Boone, D. R. 2006. The order methanobacteriales. *The prokaryotes*, 3, 231-243.
- Boone, D. R., Whitman, W. B., & Rouvière, P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis* (pp. 35-80). Springer, Boston, MA.
- Borris, R. P. 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of ethnopharmacology*, 51(1-3), 29-38.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Brock, F. M., Forsberg, C. W., & Buchanan-Smith, J. G. 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Applied and environmental microbiology*, 44(3), 561-569.

- Brod, D. L., Bolsen, K. K., & Brent, B. E. 1982. Effect of water temperature in rumen temperature, digestion and rumen fermentation in sheep. *Journal of Animal Science*, 54(1), 179-182.
- Brohan, P., Kennedy, J. J., Harris, I., Tett, S. F., & Jones, P. D. 2006. Uncertainty estimates in regional and global observed temperature changes: A new data set from 1850. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 111(D12).
- Broudiscou, L. P., Papon, Y., & Broudiscou, A. F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 87(3-4), 263-277.
- Brown M. S., Ponce, C. H., & Pulikanti, R. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*, 84, 25-33.
- Brown, M. S., Ponce, C. H., & Pulikanti, R. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*, 84(suppl\_13), E25-E33.
- Brulc, J. M., Antonopoulos, D. A., Miller, M. E. B., Wilson, M. K., Yannarell, A. C., Dinsdale, E. A., ... & White, B. A. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1948-1953.
- Bruneton, J. 1995. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Lavoisier publishing.
- Bryant, M. P. 1959. Bacterial species of the rumen. *Bacteriological reviews*, 23(3), 125-153.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 89(2), 761-771.
- Caballero, M., Lozano, S., & Ortega, B. 2007. Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista digital universitaria*, 8(10), 1-12.
- Cabana, R., Silva, L. R., Valentão, P., Viturro, C. I., & Andrade, P. B. 2013. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Industrial crops and products*, 48, 49-56.
- Cabrera A. L. 2012. Flora de la Provincia de Jujuy. Vol 10. INTA.
- Canul-Solis, J., Campos-Navarrete, M., Piñeiro-Vázquez, A., Casanova-Lugo, F., Barros-Rodríguez, M., Chay-Canul, A., ... & Castillo-Sánchez, L. 2020. Mitigation of rumen methane emissions with foliage and pods of tropical trees. *Animals*, 10(5), 843.

- Castillo-González, A. R., Burrola-Barraza, M. E., Domínguez-Viveros, J., & Chávez-Martínez, A. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3), 349-361.
- Cheng, K. J., Fay, J. P., Howarth, R. E., & Costerton, J. W. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3), 613-625.
- Cheng, K. J., McCowan, R. P., & Costerton, J. W. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *The American journal of clinical nutrition*, 32(1), 139-148.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *animal*, 7(s2), 253-265.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., & Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545, 556-568.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., & Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545, 556-568.
- Coleman G. S., Laurie, J. I., Bailey, J. E., & Holdgate, S. A. 1976. The Cultivation of Cellulolytic Protozoa Isolated from the Rumen. *Journal of General Microbiology* 95, 144-150.
- Colombatto, D., Morgavi, D. P., Furtado, A. F., & Beauchemin, K. A. 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. *Journal of Animal Science*, 81(10), 2628-2638.
- Cotta M. A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 772-776.
- Cotta M. A. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 48-54.
- Cotta, M. A., & Hespell, R. B. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(1), 51-58.
- Cottle, D. J., Nolan, J. V., & Wiedemann, S. G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science*, 51(6), 491-514.

- Counotte, G. H. M., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., & DeBie, M. J. A. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(4), 649-655.
- da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*, 166(1), 1-14.
- Davies, Z. S., Mason, D., Brooks, A. E., Griffith, G. W., Merry, R. J., & Theodorou, M. K. 2000. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 83(3-4), 205-221.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. CRC Press.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen microbiology* (Vol. 372). Nottingham: Nottingham University Press.
- 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), 572-582.
- 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), 313-322.
- DeRamus, H. A., Clement, T. C., Giampola, D. D., & Dickison, P. C. 2003. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *Journal of environmental quality*, 32(1), 269-277.
- Di Rienzo J., Casanoves F. Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C. Infostat versión 2018. Centro de Transferencia Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Dorman, H. D., & Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Durmic, Z., & Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), 150-162.
- Durmic, Z., Hutton, P., Revell, D. K., Emms, J., Hughes, S., & Vercoe, P. E. 2010. In vitro fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 160(3-4), 98-109.



- Durmic, Z., Moate, P. J., Eckard, R., Revell, D. K., Williams, R., & Vercoe, P. E. 2014. *In vitro* screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1191-1196.
- Duskova D, M Marounek. 2001. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Lett Appl Microbiol* 33, 159-163.
- Ehtesham, S., Vakili, A. R., Danesh Mesgaran, M., & Bankova, V. 2018. The effects of phenolic compounds in Iranian propolis extracts on *in vitro* rumen fermentation, methane production and microbial population. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(1), 33-41.
- El-Deeb, K. S., Abbas, F. A., El-Fishawy, A., & Mossa, J. S. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. *Saudi pharmaceutical journal*, 12(1), 51-53.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2006. Global anthropogenic non-CO<sub>2</sub> greenhouse gas emissions: 1990–2020. United States Environmental Protection Agency, EPA 430-R-06-003, June, 2006, Washington, DC, USA.
- European Commission, 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. Eur. Comm. L 268, 29–43.
- FAO & New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre. 2017. Low-emissions development of the beef cattle sector in Argentina - Reducing enteric methane for food security and livelihoods. Rome. 39 p
- FAO 2010. Assessment, A. L. C. Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector.
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., & Hirt, R. P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS microbiology letters*, 117(2), 157-161.
- Fioravanti, D. E., Schinella, G. R., & Tourner, H. A. 2009. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 529-539.
- Firkins, J. L., Yu, Z., & Morrison, M. 2007. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *Journal of dairy science*, 90, E1-E16.

- Flachowsky, G., & Lebzien, P. 2012. Effects of phytogetic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 70–77.
- Fondevila, M., & Dehority, B. A. 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *Journal of animal science*, 74(3), 678-684.
- Forsberg C. W., Lovelock, L. K., Krumholz, L., & Buchanan-Smith, J.G. 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 101-110.
- Fraisse, D., Carnat, A., Viala, D., Pradel, P., Besle, J. M., Coulon, J. B., ... & Lamaison, J. L. 2007. Polyphenolic composition of a permanent pasture: variations related to the period of harvesting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2427-2435.
- Fuentes M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., & Vlaeminck, B. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal Dairy Science* 92, 4456-4466.
- Garcia F. 2018. Uso de aceites esenciales para modular la actividad microbiana en el rumen con el fin de reducir la producción de metano entérico. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba (Facultad de Ciencias Agropecuarias) 104 p.
- Garcia, F., Brunetti, M. A., Lucini, E. I., Turcato, S., Moreno, M. V., Frossasco, G., ... & Martínez Ferrer, J. 2018. Essential oils from Argentinean native species reduce *in vitro* methane production. *RIA* 44 (1): 76-83.
- Garcia, F., Colombatto, D., Brunetti, M. A., Martínez, M. J., Moreno, M. V., Scorcione Turcato, M., ... & Martínez Ferrer, J. 2020. The reduction of methane production in the *in vitro* ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. *Animals*, 10(5), 786.
- Garcia, J. L., Ollivier, B. & Whitman, W. B. 2006. The order methanomicrobiales. *Prokaryotes*, 3, 208-230.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., & González, J. S. 2008b. Dose–response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 319-334.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., & González, J. S. 2008a. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 36-52.
- Garnsworthy, P. C., Craigon, J., Hernandez-Medrano, J. H., & Saunders, N. 2012. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(6), 3166-3180.

- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., ... & Tempio, G. 2013. *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Gil, A., Ghersa, C. M., & Leicach, S. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(3), 261-274.
- Goleniowski, M. E., Bongiovanni, G. A., Palacio, L., Nuñez, C. O., & Cantero, J. J. 2006. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, 107(3), 324-341.
- González, N., Galindo, J., Aldana, A. I., Moreira, O., Sarduy, L. R., Abdalla, L. A., & Santos, M. R. 2010. Evaluación de diferentes variedades de morera (*Morus alba*) en el control de la metanogénesis en líquido ruminal de búfalos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44(1), 37-41.
- Goopy, J. P., Robinson, D. L., Woodgate, R. T., Donaldson, A. J., Oddy, V. H., Vercoe, P. E., & Hegarty, R. S. 2015. Estimates of repeatability and heritability of methane production in sheep using portable accumulation chambers. *Animal Production Science*, 56(1), 116-122.
- Grainger, C., & Beauchemin, K. A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Animal feed science and technology*, 166, 308-320.
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S. M., Auldist, M. J., Beauchemin, K. A., Hannah, M. C., ... & Eckard, R. J. 2007. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF6) tracer and chamber techniques. *Journal of dairy science*, 90(6), 2755-2766.
- Grassmann, J. 2005. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones*, 72, 505-535.
- Groot, J. C., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M., & Lantinga, E. A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 64(1), 77-89.
- Haque, M. N. 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of animal science and technology*, 60(1), 1-10.
- Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- Hegarty, R. S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(8), 1321-1328.

- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., & Janssen, P. H. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*, 5(1), 1-15.
- Hernández, N. E., Tereschuk, M. L., & Abdala, L. R. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 317-322.
- Herrero, M., Gerber, P., Vellinga, T., Garnett, T., Leip, A., Opio, C., ... & McAllister, T. A. 2011. Livestock and greenhouse gas emissions: The importance of getting the numbers right. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 779-782.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F. J., Mantecón, Á. R., & Del Pino, M. C. Á. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal feed science and technology*, 109(1-4), 65-78.
- 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.
- Hill, R. W., & Wyse, G. A. 2006. *Fisiología animal*. Ed. Médica Panamericana.
- Ho, Y. W., Bauchop, T., Abdullah, N., & Jalaludin, S. 1990. *Ruminomyces elegans* gen. et sp. nov., a polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon*, 38, 397-405.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 374-380.
- Hook, S. E., Wright, A. D. G., & McBride, B. W. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*.
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., ... & Tricarico, J. M. 2013. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of animal science*, 91(11), 5045-5069.
- IPCC, 2006. Intergovernmental Panel on Climate Change: *Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme*. Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T. and Tanabe K. (eds). Published: IGES, Japan.
- IPCC, 2007. Intergovernmental Panel on Climate Change: *The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.

- IPCC, 2013. Intergovernmental Panel on Climate Change. *The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- IPCC, 2014. Intergovernmental Panel on Climate Change. *Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Ivan, M., Petit, H. V., Chiquette, J., & Wright, A. D. 2013. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 109(7), 1211-1218.
- 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.
- Janssen, P. H., & Kirs, M. 2008. Structure of the *archaeal* community of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3619-3625.
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H. P., & Becker, K. 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 209, 60-68.
- Jayanegara, A., Marquardt, S., Wina, E., Kreuzer, M., & Leiber, F. 2013. *In vitro* indications for favourable non-additive effects on ruminal methane mitigation between high-phenolic and high-quality forages. *British Journal of Nutrition*, 109(4), 615-622.
- Jeffrey, C. 2007. Compositae: Introduction with key to tribes. *Families and Genera of Vascular Plants*, 8, 61-87.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., & Mosley, E. E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of animal science*, 86(2), 397-412.
- Jiménez-Peralta, F. S., Salem, A. Z. M., Mejia-Hernández, P., González-Ronquillo, M., Albarrán-Portillo, B., Rojo-Rubio, R., & Tinoco-Jaramillo, J. L. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livestock Science*, 136(2-3), 192-200.

- Joblin, K. N. 2005. Methanogenic archaea. *In Methods in gut microbial ecology for ruminants* (pp. 47-53). Springer, Dordrecht.
- Johnson, K. A. & Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of animal science*, 73(8), 2483-2492.
- Jordan, E., Lovett, D. K., Monahan, F. J., Callan, J., Flynn, B., & O'mara, F. P. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science*, 84(1), 162-170.
- Kajikawa, H. 2003. Operation and characteristics of newly improved and marketable artificial rumen (Rusitec). *Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science*, 2, 1-49.
- Kamra, D. N., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C. 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In *International Congress Series* (Vol. 1293, pp. 156-163). Elsevier.
- Kamra, D. N., Sawal, R. K., Pathak, N. N., Kewalramani, N., & Agarwal, N. 1991. Diurnal variation in ciliate protozoa in the rumen of black buck (*Antilope cervicapra*) fed green forage. *Letters in applied microbiology*, 13(3), 165-167.
- Kaplan, L. 1960. Historical and ethnobotanical aspects of domestication in Tagetes. *Economic Botany*, 14(3), 200-202.
- Katinas, L., Gutiérrez, D. G., Grossi, M. A., & Crisci, J. V. 2007. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2), 113-129.
- Kim, E. T., Kim, C. H., Min, K. S., & Lee, S. S. 2012. Effects of plant extracts on microbial population, methane emission and ruminal fermentation characteristics in *in vitro*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(6), 806.
- Kim, E. T., Le Luo Guan, S. J. L., Lee, S. M., Lee, S. S., Lee, I. D., Lee, S. K., & Lee, S. S. 2015. Effects of flavonoid-rich plant extracts on *in vitro* ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(4), 530.
- Kim, M., Park, T., & Yu, Z. 2017. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 30(11), 1515.
- King, E. E., Smith, R. P., St-Pierre, B., & Wright, A. D. G. 2011. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. *Applied and environmental microbiology*, 77(16), 5682-5687.

- Kittelmann, S., Naylor, G. E., Koolaard, J. P., & Janssen, P. H. 2012. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class Neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS one*, 7(5), e36866.
- Kittelmann, S., Pinares-Patino, C. S., Seedorf, H., Kirk, M. R., Ganesh, S., McEwan, J. C., & Janssen, P. H. 2014. Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. *PLoS one*, 9(7), e103171.
- 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.
- Knapp, J. R., Laur, G. L., Vadas, P. A., Weiss, W. P., & Tricarico, J. M. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of dairy science*, 97(6), 3231-3261.
- Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M., & Rode, L. M. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *Journal of Animal Science*, 78(9), 2431-2445.
- Koike, S., & Kobayashi, Y. 2009. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(1), 131-138.
- Krause, K. M., & Oetzel, G. R. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal feed science and technology*, 126(3-4), 215-236.
- Kruger, D., & Franklin, P. 2006. The Methane to Markets Partnership: Opportunities for coal mine methane utilization. In *11th US/North American mine ventilation symposium* (pp. 3-8).
- Kumar, R., Kamra, D. N., Agarwal, N., Chaudhary, L. C., & Zadbuke, S. S. 2011. Effect of tree leaves containing plant secondary metabolites on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 11(1), 103-114.
- Kumar, S., Dagar, S. S., & Puniya, A. K. 2012. Isolation and characterization of methanogens from rumen of Murrah buffalo. *Annals of microbiology*, 62, 345-350.
- Lana, R. P., Russell, J. B., & Van Amburgh, M. E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of animal science*, 76(8), 2190-2196.
- Landau, S., Perevolotsky, A., Bonfil, D., Barkai, D., & Silanikove, N. 2000. Utilization of low quality resources by small ruminants in Mediterranean agro-pastoral systems: the case of browse and aftermath cereal stubble. *Livestock Production Science*, 64(1), 39-49.

- Larue, R., Yu, Z., Parisi, V. A., Egan, A. R., & 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. *Environmental microbiology*, 7(4), 530-543.
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Altermann, E., Ronimus, R. S., Yeoman, C. J., Pacheco, D. M., ... & Attwood, G. T. 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS one*, 5(1), e8926.
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Ronimus, R. S., Wedlock, N., Altermann, E., & Attwood, G. T. 2013. Genome sequencing of rumen bacteria and *archaea* and its application to methane mitigation strategies. *Animal*, 7(s2), 235-243.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N. S., ... & Rogalski, J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*, 27(2-3), 175-185.
- Leung, A.Y. Encyclopedia of Common Natural Ingredients. Essential Oils of *Tagetes minuta* from Brasil; 1980. A Wiley Interscience Publications, p. 42-3.
- Liu K., Wang J., Bu D., Zhao S., McSweeney C., Yu P., & Li, D. 2009. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(4), 605-611.
- Liu, H., Vaddella, V., & Zhou, D. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of dairy science*, 94(12), 6069-6077.
- Lovett, D., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J., & O'Mara, F. P. 2003. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livestock Production Science*, 84(2), 135-146.
- Machmüller, A., Soliva, C. R., & Kreuzer, M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 43(1), 41-55.
- Mackie, R. I., & Heath, S. 1979. Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(3), 416-421
- Mackie, R. I., & White, B. A. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *Journal of dairy science*, 73(10), 2971-2995.



- Mackie, R. I., Aminov, R. I., White, B. A., & McSweeney, C. S. 2000. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. *Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction*, 2000, 61-77.
- Madigan, T. M.; Martinko M, J. & Parker J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. Ed. I Capella.
- Makkar, H. P. 2003. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*. Springer Science & Business Media.
- Martin, S. A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *Journal of animal science*, 76(12), 3123-3132.
- Martínez Ferrer, J., García, F., Brunetti, M. A., Cora, A., Frossasco, G., Lucini, E., ... & Colombatto, D. 2014. Evaluación in vitro del potencial anti metanogénico de aceites esenciales extraídos de plantas nativas de Argentina. In *Primera conferencia de gases de efecto invernadero en sistemas agropecuarios de Latinoamérica (GALA)*. INIA. Chile (pp. 95-96).
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Saro, C., & Carro, M. D. 2010. The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Animal Feed Science and Technology*, 158(3-4), 126-135.
- 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), 3004-3018.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K., & Mathison, G. W. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(2), 231-243.
- McAllister, T. A., Rode, L. M., Major, D. J., Cheng, K. J., & Buchanan-Smith, J. G. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Canadian Journal of Animal Science*, 70(2), 571-579.
- McCann, J. C., Elolimy, A. A., & Loor, J. J. 2017. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 33(3), 539-553.
- McSweeney, C. S., Blackall, L. L., Collins, E., Conlan, L. L., Webb, R. I., Denman, S. E., & Krause, D. O. 2005. Enrichment, isolation and characterisation of ruminal bacteria that degrade non-protein amino acids from the tropical legume *Acacia angustissima*. *Animal feed science and technology*, 121(1-2), 191-204.
- McVaugh, R. 1987. *Flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of western Mexico. Volume 5. Leguminosae*. University of Michigan Press.

- Medjekal, S., Bodas, R., Bousseboua, H., & López, S. 2017. Evaluation of three medicinal plants for methane production potential, fiber digestion and rumen fermentation *in vitro*. *Energy Procedia*, 119, 632-641.
- Mendoza, L., Tapia, L., Wilkens, M., & Urzúa, A. 2002. Antibacterial activity of 13-epi-sclareol, a labdane type diterpene isolated from *Pseudognaphalium heterotrichium* and *P. cheiranthifolium* (Asteraceae). *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 47(2), 91-98.
- 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. *Animal Feed Science and Technology*, 31(1-2), 55-64.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., & Fonty, G. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *Journal of animal science*, 80(3), 790-796.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo sustentable. 2017: Segundo informe bienal de actualización de la República Argentina a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., & Morrison, M. 2001. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of dairy science*, 84(6), 1294-1309.
- Montiel, M., D. Depetris, G. J., Colombatto, D., Maldonado, L., Cerón Cucchi, M., Palacios, A., & Cano, A. 2018. Utilización de propóleos como aditivo: producción de metano ruminal y degradabilidad *in vitro*. Mar del Plata, Argentina. 41° congreso argentino de producción animal. *Asociación Argentina de Producción Animal*.
- Morel, F. M., Kraepiel, A. M., & Amyot, M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual review of ecology and systematics*, 29(1), 543-566.
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *animal*, 4(7), 1024-1036.
- Morgavi, D. P., Kelly, W. J., Janssen, P. H., & Attwood, G. T. 2013. Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. *animal*, 7(s1), 184-201.
- Moss, A. R., Jouany, J. P., & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. In *Annales de zootechnie* (Vol. 49, No. 3, pp. 231-253). EDP Sciences.
- Mould, F. L., & Ørskov, E. R. 1983. 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), 1-14.

- Muetzel, S., Hunt, C., & Tavendale, M. H. 2014. A fully automated incubation system for the measurement of gas production and gas composition. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 1-11.
- Múlgura de Romero, M. E., Atkins, S., & Rotman, A. D. 2003. Verbenaceae, parte I. Subfamilia I. Verbenoideae, parte 1. Tribu II. Parte A. *Flora Fanerogámica Argentina*, 84, 1-46.
- Múlgura, M. E., O'Leary, N., & Rotman, A. 2012. Flora Argentina, vol. 14, Dicotyledonae: Verbenaceae. *Buenos Aires: Estudio Sigma*.
- Murphy, M. R., Baldwin, R. L., & Koong, L. J. 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 55(2), 411-421.
- Murray, R. M., Bryant, A. M., & Leng, R. A. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, 36(1), 1-14.
- Naas, A. E., & Pope, P. B. 2019. A mechanistic overview of ruminal fibre digestion.
- Nagaraja, T. G., & Titgemeyer, E. C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of dairy science*, 90, E17-E38.
- Nathani, N. M., Patel, A. K., Mootapally, C. S., Reddy, B., Shah, S. V., Lunagaría, P. M., ... & Joshi, C. G. 2015. Effect of roughage on rumen microbiota composition in the efficient feed converter and sturdy Indian Jaffrabadi buffalo (*Bubalus bubalis*). *BMC genomics*, 16(1), 1-15.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).
- Newbold C. J., McIntosh F. M., Williams P., Losa R. & Wallace R. J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114:105–112.
- Newbold, C. J., McKain, N., & Wallace, R. J. 1993. Combined effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract and monensin on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *The Journal of Agricultural Science*, 121(2), 241-246.
- Núñez, M., Aguado, M. I., Bela, A., Vonka, C., & Sansberro, P. 2007. Farmacognosia y Fitoquímica de *Lippia turbinata* G., Verbenaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5), 262-263.
- Ojeda, M., Karlin, U. O., Martínez, G. J., Massuh, Y., Ocano, S. F., Torres, L. E., ... & Cuironi, A. 2015. Plantas aromáticas y medicinales: Modelos para su domesticación,

producción y usos sustentables. *Editorial Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.*

- Olivier, J. G., Van Aardenne, J. A., Dentener, F. J., Pagliari, V., Ganzeveld, L. N., & Peters, J. A. 2005. Recent trends in global greenhouse gas emissions: regional trends 1970–2000 and spatial distribution of key sources in 2000. *Environmental Sciences*, 2(2-3), 81-99.
- Olubobokun, J. A., & Craig, W. M. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *Journal of Animal Science*, 68(10), 3360-3370.
- Ortiz-Chura, A., Gere, J., Marcoppido, G., Depetris, G., Cravero, S., Faverín, C., ... & Cerón-Cucchi, M. E. 2021. Dynamics of the ruminal microbial ecosystem, and inhibition of methanogenesis and propiogenesis in response to nitrate feeding to Holstein calves. *Animal Nutrition*.
- Ortiz-Chura, A., Pepi, M. F., Wawrzkievicz, M., Cucchi, M. C., Cravero, S., & Jaurena, G. 2018. Microbial populations and ruminal fermentation of sheep and llamas fed low quality forages. *Small Ruminant Research*, 168, 47-51.
- Oskoueian, E., Abdullah, N., & Oskoueian, A. 2013. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *BioMed research international*, 2013.
- Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., & Theodorou, M. K. 2001. *Cyllumyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6), 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. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 69(3), 499-506.
- Pal, K., Patra, A. K., Sahoo, A., & Kumawat, P. K. 2015. Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation *in vitro*. *Livestock Science*, 180, 98-105.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., & Villar, A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Patra, A. K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(4), 1929-1952.
- Patra, A. K., & Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 363-375.

- 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.
- Patra, A. K., & Yu, Z. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4271-4280.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., & Agarwal, N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3-4), 276-291.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., & Agarwal, N. 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), 511-520
- Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., & Brune, A. 2012. "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and environmental microbiology*, 78(23), 8245–8253.
- Paynter, M. J. B., & Hungate, R. E. 1968. Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp. n., isolated from the bovine rumen. *Journal of bacteriology*, 95(5), 1943-1951.
- Pell, A. N., & Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of dairy science*, 76(4), 1063-1073.
- Pinares-Patiño, C. S., Ulyatt, M. J., Lassey, K. R., Barry, T. N., & Holmes, C. W. 2003. Persistence of differences between sheep in methane emission under generous grazing conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 140(2), 227-233.
- Poulsen, M., Schwab, C., Jensen, B. B., Engberg, R. M., Spang, A., Canibe, N., . & Urich, T. 2013. *Methylophilic methanogenic Thermoplasmata* implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nature communications*, 4(1), 1-9.
- Preston, T. R., & Leng, R. A. 1989. The greenhouse effect and its implications for world agriculture. The need for environmentally friendly development. *Livestock research for rural development*, 1(1), 21-30.
- Puniya, A. K., Singh, R., & Kamra, D. N. (Eds.). 2015. Rumen microbiology: from evolution to revolution. New Delhi: Springer India.
- Qiao, J., Tan, Z., & Wang, M. 2014. Potential and existing mechanisms of enteric methane production in ruminants. *Scientia Agricola*, 71(5), 430-440.
- R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

- Ratera, E. L., & Ratera, M. O. 1980. *Plantas de la flora argentina empleados en medicina popular* (No. 581.634 R3).
- Relling, A. E., & Mattioli, G. A. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. *Argentina: UNLP Editorial Edulp*, 23-55.
- Robinson, P. H. 2010. Yeast products for growing and lactating ruminants: a literature summary of impacts on rumen fermentation and performance. *Cooperative Extension Specialist Department of Animal Science, University of California, Davis, CA, 95616*.
- Rodríguez Quiroz T. A. 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. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Bogotá D.C. 113 p.
- Russell, J. B. & Rychlik, J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292(5519), 1119-1122.
- Russell, J. B., & Houlihan, A. J. 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS microbiology reviews*, 27(1), 65-74.
- Russell, J. B., & Mantovani, H. C. 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 4(4), 347-355.
- 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, 9-30
- Sadia, S., Khalid, S., Qureshi, R., & Bajwa, A. A. 2013. *Tagetes minuta* L., a useful underutilized plant of family Asteraceae: a review. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 19(2).
- Sagrera, L. V. 2011. Los avances y progresos de la República Argentina en la disminución de las emisiones de CO<sub>2</sub>, luego de la vigencia del protocolo de Kyoto. *Provincia*, (25), 73-91.
- Sales-Duval M., Lucas, F. & Blanchart, G. 2002. Effects of exogenous ammonia or free amino acids on proteolytic activity and protein breakdown products in *Streptococcus bovis*, *Prevotella albensis*, and *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Current Microbiology* 44, 435-443.
- Salvat, A., Antonacci, L., Fortunato, R. H., Suárez, E. Y., & Godoy, H. M. 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*, 11(2-3), 230-234.

- Santamaría, J. 2010. Forzamiento radiativo y cambios químicos en la atmósfera. *XI Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. Universidad Complutense de Madrid. Facultad Ciencias Químicas.*
- Santos, H. S., Mesquita, F. M. R., Lemos, T. L. G., Monte, F. J. Q., & Braz-Filho, R. 2008. Casbane diterpenes and acetophenones of *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). *Quimica Nova*, 31(3), 601-604.
- Schofield, P., Pitt, R. E., & Pell, A. N. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of animal science*, 72(11), 2980-2991.
- Sejian, V. 2011. Global climate change: role of livestock. *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 3(1), 19-25.
- Selem, A. S. M. A. 2012. Effect of propolis on ruminal fermentation, reproductive and productive performance of Santa Ines ewes. Tesis de doctorado. Universidade de São Paulo 118 p.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., & Ercisli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1).
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) 2013. <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php#>
- Seshadri, R., Leahy, S. C., Attwood, G. T., Teh, K. H., Lambie, S. C., Cookson, A. L., ... & Kelly, W. J. 2018. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature biotechnology*, 36(4), 359-367.
- Sharp, R., Ziemer, C. J., Stern, M. D., & Stahl, D. A. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(1), 71-78.
- Sirohi, S. K., Pandey, N., Goel, N., Singh, B., Mohini, M., Pandey, P., & Chaudhry, P. P. 2009. Microbial activity and ruminal methanogenesis as affected by plant secondary metabolites in different plant extracts. *International Journal of Environmental Science and Engineering*, 1(1), 52-58.
- Sirohi, S. K., Pandey, N., Singh, B., & Puniya, A. K. 2010. Rumen methanogens: a review. *Indian journal of microbiology*, 50(3), 253-262.
- Sirohi, S. K., Singh, N., Dagar, S. S., & Puniya, A. K. 2012. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(5), 1135-1154.
- St-Pierre, B., & Wright, A. D. 2013. Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. *animal*, 7(s1), 49-56.

- Tahir, L., & Khan, N. 2012. Antibacterial potential of crude leaf, fruit and flower extracts of *Tagetes minuta* L. *Journal of Public Health and Biological Sciences*, 1(3), 74-78.
- 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.
- Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., & Ho, Y. W. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal feed science and technology*, 169(3-4), 185-193.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T., & Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 403-419.
- Tedeschi, L. O., Muir, J. P., Naumann, H. D., Norris, A. B., Ramírez-Restrepo, C. A., & Mertens-Talcott, S. U. 2021. Nutritional Aspects of Ecologically Relevant Phytochemicals in Ruminant Production. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 155.
- Tekippe, J. A., Tacoma, R., Hristov, A. N., Lee, C., Oh, J., Heyler, K. S., ... & Bravo, D. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy science*, 96(12), 7892-7903.
- Tereschuk, M. L., Baigorí, M. D., De Figueroa, L. I., & Abdala, L. R. 2004. Flavonoids from Argentine *Tagetes* (Asteraceae) with antimicrobial activity. In *Public Health Microbiology* (pp. 317-330). Humana Press.
- Tereschuk, M. L., Riera, M. V., Castro, G. R., & Abdala, L. R. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56(3), 227-232.
- 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), 579-591.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3-4), 185-197.
- Thuille, N., Fille, M., & Nagl, M. 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *International journal of hygiene and environmental health*, 206(3), 217-221.



- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., & Luo, Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food chemistry*, 113(1), 173-179.
- Tilley, J. M. A., & Terry, D. R. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and forage science*, 18(2), 104-111.
- Ulyatt, M. J., Lasey, K. R., Shelton, I. D., & Walker, C. F. 2002. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 45(4), 227-234.
- Ungerfeld, E. M., & Kohn, R. A. 2006. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. *Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, 55-85.
- Ungerfeld, E. M., Aedo, M. F., Martínez, E. D., & Saldivia, M. 2019. Inhibiting methanogenesis in rumen batch cultures did not increase the recovery of metabolic hydrogen in microbial amino acids. *Microorganisms*, 7(5), 115.
- Van Kessel, J. A. S., & Russell, J. B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS microbiology ecology*, 20(4), 205-210.
- Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. 1996. Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and assessment*, 42(1), 73-97.
- Van Soest, P. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597.
- Van Zijderveld, S. M., Fonken, B., Dijkstra, J., Gerrits, W. J. J., Perdok, H. B., Fokkink, W., & Newbold, J. R. 2011. Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(3), 1445-1454.
- Van Zwieten, J. T., Van Vuuren, A. M., & Dijkstra, J. 2008. Effect of nylon bag and protozoa on *in vitro* corn starch disappearance. *Journal of dairy science*, 91(3), 1133-1139.
- Vasta, V., Daghighi, M., Cappucci, A., Buccioni, A., Serra, A., Viti, C., & Mele, M. 2019. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of dairy science*, 102(5), 3781-3804.

- Vergé, X. P. C., Dyer, J. A., Desjardins, R. L., & Worth, D. 2007. Greenhouse gas emissions from the Canadian dairy industry in 2001. *Agricultural Systems*, 94(3), 683-693.
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97-110.
- Wallace, R. J., Cheng, K. J., Dinsdale, D., & Ørskov, E. R. 1979. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. *Nature*, 279(5712), 424-426.
- Wallace, R. J., Sasson, G., Garnsworthy, P. C., Tapio, I., Gregson, E., Bani, P., ... & Mizrahi, I. 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. *Science advances*, 5(7), eaav8391.
- Weimer P. J. 1996. Why Don't Ruminant Bacteria Digest Cellulose Faster?. *Journal of Dairy Science*, 79, 1496-150
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science*, 76(12), 3114-3122.
- Wenk, C. 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(2), 282-289.
- Wereszka K, & T Michalowski. 2012. The ability of the rumen ciliate protozoan *Diploplastron affine* to digest and ferment starch. *Folia Microbiol* 57, 375-377.
- Wernert, M. F., Wagner, M. L., Gurni, A. A., Carballo, M. A., & Ricco, R. A. 2009. Estudio de polifenoles de infusiones y cocimientos de hojas de "Cedrón" (*Aloysia citrodora* Palau) y "Poleo" (*Lippia turbinata* Griseb.) -Verbenaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 308-311.
- West, T. O. & Marland, G. 2002. A synthesis of carbon sequestration, carbon emissions, and net carbon flux in agriculture: comparing tillage practices in the United States. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 91(1-3), 217-232.
- Whitford, M. F., Teather, R. M., & Forster, R. J. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC microbiology*, 1(1), 1-5.
- Williams, A. G., & Coleman, G. S. 2012. *The rumen protozoa*. Springer Science & Business Media.
- Witzig, M., Zeder, M., & Rodehutsord, M. 2018. Effect of the ionophore monensin and tannin extracts supplemented to grass silage on populations of ruminal cellulolytics and methanogens *in vitro*. *Anaerobe*, 50, 44-54.

- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wolin, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S. 1997. Microbe-microbe interactions. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 467-491). Springer, Dordrecht.
- Wright, A. D. G., & Klieve, A. V. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?. *Animal feed science and technology*, 166, 248-253.
- Yan, T., Mayne, C. S., Gordon, F. G., Porter, M. G., Agnew, R. E., Patterson, D. C., ... & Kilpatrick, D. J. 2010. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2630-2638.
- Yáñez Ruiz, D. R., Moumen, A., Martin Garcia, A. I., & Molina Alcaide, E. 2004. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of animal science*, 82(7), 2023-2032.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Bannink, A., Dijkstra, J., Kebreab, E., Morgavi, D. P., O'Kiely, P., ... & Hristov, A. N. 2016. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 1-18.
- Yokoyama M. T. and Johnson K. A. 1988. Microbiología del rumen e intestino. *El Rumiante. Fisiología Digestiva y Nutrición. Acribia. Zaragoza, España*, 137-157.
- Yu, Z., & Morrison, M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36(5), 808-812.
- Zhang, T., & Fang, H. H. 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 281-289.
- Zhou, M., 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), 3776-3786.

## ANEXO

**Cuadro 16:** Características de las principales bacterias ruminales. Adaptado de Castillo-González *et al.* (2014) y Puniya *et al.* (2015).

Género	Tinción Gram	Morfología	Productos de fermentación	Referencia
<b>Bacterias fibrolíticas</b>				
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Negativo	Bacilo	Succinato, Acetato, Formiato	Ivan <i>et al.</i> (2013)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Positivo	Esférico	Formiato, Succinato, Lactato, H <sub>2</sub>	
<i>Ruminococci albus</i>	Positivo	Cóccido	Acetato, Formiato, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , etanol	Michalet-Doreau <i>et al.</i> (2002)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Negativo	Bacilo curvo	Acetato, Formiato, Lactato, Butirato, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Weimer (1996)
<i>Prevotella ruminicola</i>	Negativo	Bacilo	Succinato, Formiato, Acetato	Bryant (1959)
<i>Clostridium lochheadii</i>	Positivo	Bacilo (espora)	Acetato, Formiato, Butirato, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Weimer (1996)
<b>Bacterias pectinolíticas</b>				
<i>Lanchospira multiparus</i>	Positivo	Bacilo curvo	Acetato, Formiato, Lactato, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	
<i>Prevotella ruminicola</i>				Duskova and Marounek (2001)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>				

---

**Bacterias amilolíticas**


---

<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Negativo	Bacilo	Formiato, Acetato, Succinato	Cotta (1988)
<i>Selenomonas ruminnantium</i>	Negativo	Bacilo curvo	Acetato, Propionato, Lactato	Cotta (1992)
<i>Succinomonas amylofítica</i>	Negativo	Oval	Acetato, Propionato, Succinato, Lactato	Bryant (1958)
<i>Streptococci bovis</i>	Positivo	Cóccido	Lactato	Cotta (1988) McAllister <i>et al.</i> (1990)

---

**Bacterias proteolíticas**


---

<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Negativo	Bacilo curvo		Cotta <i>and</i> Hespell (1986)
<i>Bacteroides rutminicola</i>				Cotta <i>and</i> Hespell (1986)
<i>Bacteroides amylophilus</i>				Cotta <i>and</i> Hespell (1986)
<i>Streptococcus bovis</i>	Positivo	Cóccido		Sales-Duval <i>et al.</i> (2002)
<i>Prevotella albensis</i>				Sales-Duval <i>et al.</i> (2002)

---

**Bacterias lipolíticas**


---

<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Negativo	Bacilo	Acetato, Propionato, Acetato	Fuentes <i>et al.</i> (2009)
<b>Bacterias lactolíticas</b>				
<i>Selenomonas lactilytica</i>	Negativo	Bacilo curvo	Acetato, Succinato	Brown <i>et al.</i> (2006)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Positivo	Cóccido	Acetato, Propionato, Butirato, Valerato, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	

**Cuadro 17:** Características de las principales *archaeas* ruminales.

Orden	Familia	Género	Especie	Referencia
<i>Methanobacteriales</i>	<b><i>Methanothermaceae:</i></b> Bacilos simples y cadenas cortas de bacilos. Los sustratos para la metanogénesis son H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> . Gram (+). Sin crecimiento por debajo de 60°C y crecimiento óptimo por encima de 70°C.	<i>Methanothermus</i>		Bonin <i>and</i> Boone (2006);
	<b><i>Methanobacteriaceae:</i></b> Cocos cortos, barras cortas a largas o barras filamentosas. Los sustratos para la metanogénesis son H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , formiato y CO (que también pueden estar oxidados), metanol (que puede ser reducido), y alcoholes secundarios + CO <sub>2</sub> . Gram (+). Ningún crecimiento por encima de 70°C.	<i>Methanobacterium</i> (Mb.): Presentan un rango más amplio en cuanto a formas y temperaturas (mesófilas y termófilas).	<i>Mb. aarhusense</i>	Boone <i>et al.</i> (1993); Sirohi <i>et al.</i> (2010); Jansen <i>and</i> Kris (2008); St-Pierre <i>and</i> Wright (2013);
			<i>Mb. alacliphilum</i> <i>Mb. byantii</i> <i>Mb. Formicicum</i>	
	<i>Methanobrevibacter</i> (Mbr.): Son los metanógenos más abundantes encontrados en rumen. Presentan poca motilidad y crecen con temperaturas entre 37 y 39°C	<i>Mbr. smithii</i> <i>Mbr. gotschalkii</i> <i>Mbr. thauri</i> <i>Mbr. ruminantium</i> <i>Mbr. olleyae</i> <i>Mbr. millerae</i> <i>Mbr. wolinii</i> <i>Mbr. woesei</i> <i>Mbr. arboriphilus</i>	King <i>et al.</i> (2011); Puniya <i>et al.</i> (2015)	

		<i>Methanospahera</i>	<i>Metahnosphaera stadtmannae</i>	
		<i>Methanothermobacter</i>		
<b>Methanosarcinales</b>	<b>Methanosaetaceae</b>			Hook <i>et al.</i> (2010)
	<b>Methanosarcinaceae</b>	Methanosarcina	<i>Metahnosarcina barkeri</i> <i>Metahnosarcina mazei</i>	
<b>Methanomicrobiales:</b> Contienen glicoproteínas en lugar de pseudomureinas; morfología variada; requieren un co-factor estable al calor. Tinción Gram positivo.	<b>Metahnoregulaceae</b>			Garcia <i>et al.</i> (2006); Kumar <i>et al.</i> (2012)
	<b>Methanospirilaceae</b>			
	<b>Metahnocospusculaceae</b>			
	<b>Metahnomicrobiaceae</b>		<i>Methanobricobium mobile</i> <i>Methanoculleus olentangyi</i>	
<b>Metanoplasmatales:</b> Generalmente encontrados en ambientes marinos, suelo, intestinos de termitas y mamíferos. Pertenecen a una nueva línea llamada rumen cluster C (RCC).				Paul <i>et al.</i> (2012)

**Cuadro 18:** Características de los protozoarios ruminales.

<b>Género</b>	<b>Productos de fermentación</b>	<b>Referencia</b>
<b>Celulolíticos</b>		
<i>Eunoploplastron triloricastrum</i>	Azúcares reducidos	Coleman <i>et al.</i> (1976)
<i>Eudiplodinium maggi</i>		
<i>Diploplastron affine</i>		
<i>Epidinium ecaudatum</i>		
<i>Diplonidium monacanthum</i>		
<i>Diplonidium pentacanthum</i>		
<b>Proteolíticos</b>		
<i>Entodinium caudatum</i>	Amonio, AGV	Ivan <i>et al.</i> (2000)
<i>Eudiplodinium medium</i>		Forsberg <i>et al.</i> (1984)
<b>Amilolíticos</b>		

<i>Diploplastron affine</i>	Maltosa, maltotriosa, y glucosa	Wereszka and Michalowski (2012)
-----------------------------	---------------------------------	---------------------------------

**Cuadro 19:** Ingredientes y composición química del sustrato utilizado en g/kg MS.

Ingredientes del sustrato	MS	MO	Cen	PB	FDN	FDA	DMSiv	CE (Mcal/kg MS)
Grano de maíz molido	899	985	15	85	122	29	877	2,55
Heno de alfalfa	904	880	120	211	464	287	707	3,16

MS: materia seca; MO: materia orgánica; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; DMSiv: digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

**Cuadro 20:** Ingredientes y composición química de la dieta de los animales en g/kg MS.

Ingredientes de la dieta	MO	Cen	PB	FDN	FDA	DMSiv
Grano de maíz molido	982	18	100	154	31	966
Heno de alfalfa 1ª semana	906	94	152	532	395	69
Heno de alfalfa 2ª semana	887	113	197	603	410	62
Heno de alfalfa 3ª semana	900	100	196	607	410	62

MO: materia orgánica, Cen: Cenizas; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra Detergente Neutro, FDA: Fibra Detergente Ácido, DMSiv: digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

**Cuadro 21:** Ingredientes y composición química de los sustratos Pan y TMR en g/kg MS.

Ingredientes del sustrato	MS	MO	Cen	PB	FDN	FDA	DMSiv
Pan	921	893	107	39	780	464	580
TMR	929	943	57	158	312	172	850

MS: materia seca; MO: materia orgánica; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; DMSiv: digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

**Cuadro 22:** Ingredientes y composición química de la dieta de los animales en g/kg MS (ensayo presentado en Capítulo 3).

Ingredientes de la dieta	MO	Cen	PB	FDN	FDA	DMSiv
Grano de maíz molido	984	16	80	144	323	953
Heno de alfalfa 1ª semana	890	110	176	540	359	63
Heno de alfalfa 2ª semana	875	125	204	546	356	65



Heno de alfalfa 3ª semana	869	131	176	544	375	62
---------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	----

MO: materia orgánica; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; DMSiv: digestibilidad de la materia seca *in vitro*.

**Cuadro 23:** Ingredientes y composición química de la dieta de los animales en g/kg MS (ensayo presentado en Capítulo 4).

<b>Ingredientes de la dieta</b>	<b>MO</b>	<b>Cen</b>	<b>PB</b>	<b>FDN</b>	<b>FDA</b>	<b>DMSiv</b>
Grano de maíz molido	984	16	79	106	228	958
Heno de alfalfa 1ª semana	912	88	163	604	423	64
Heno de alfalfa 2ª semana	902	98	197	625	418	63
Heno de alfalfa 3ª semana	910	90	178	674	423	63

MO: materia orgánica; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; DMSiv: digestibilidad de la materia seca *in vitro*.