



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y

DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**CAMBIOS EN LAS POBLACIONES DE BACTERIAS
METANOGÉNICAS Y EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL DE
BOVINOS ALIMENTADOS BAJO DIFERENTES ESTRATEGIAS DE
ALIMENTACIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

JOSÉ HIRAM MÉNDEZ RAMÍREZ

TUTOR:

DR. RICARDO BASURTO GUTIERREZ

(PROGRAMA CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL, INIFAP)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. PEDRO GARCÉS YEPEZ

(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM)

DR. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

(UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO)

CUAUTITLAN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A Dios, que me prestó la vida necesaria.

Para mis padres Aurora y José de Jesús, que me dieron la vida y sembraron en mí amor, cariño, dedicación y paciencia que han dado como fruto la culminación de este trabajo.

Para mis hermanos, Levi Alejandro y César Iván, que siempre se preocupan y quieren lo mejor para mí. Compañeros de mi vida por siempre.

Para Fabi, quien ocupa mi corazón. Te agradezco por creer tanto en mí y hacerme ver las cosas en diferente perspectiva cuando tuve momentos difíciles. Te amo.

Al Dr. Ricardo Basurto Gutiérrez. Le doy las gracias por haberme introducido a este mundo tan bonito que es la ecología del animal rumiante, así mismo también por sus enseñanzas, amistad, paciencia y guía durante mi camino.

Finalmente, a mis compañeros y amigos de generación: César VR, Selene JJ, Nancy BC, Diego C, Julio BV, Marco RI y Enoc MM. Considero que fui muy afortunado en conocerlos y vivir experiencias inolvidables en este ciclo junto a ustedes.

Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), la cual hace posible los estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), que me dio la oportunidad y todas las facilidades para mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para la realización de mis estudios.

Al Centro Nacional de investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, por ser la sede de la maestría y por el apoyo de todo el personal científico que contribuyó a mi formación.

A la Dra. Elba Rodríguez Hernández del CENID FISIOLÓGÍA por su ayuda para el montaje de la Técnica de qPCR.

Al laboratorio de Nutrición animal del CENID FISIOLÓGÍA. En especial a la

Q en A Ericka Ramírez Rodríguez, a los técnicos de laboratorio Felipe de Jesús Olvera Barrera, José Julián Martínez Espinoza, Yesenia Jiménez Díaz y Jhosafat Cruz Calixto por sus enseñanzas y ayuda para la realización de los análisis.

Al Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (A-03) del Instituto de Neurobiología del Campus Juriquilla de la UNAM, en especial a la Dra. María Ofelia Mora Izaguirre por contribuir a mi formación y por su apoyo en todos los aspectos para la medición y análisis de qPCR. De igual forma también quiero agradecer a la M en C María Laura Gonzáles Dávalos y al M en C Carlos Lozano Flores por sus enseñanzas, ayuda y paciencia para la realización del análisis de qPCR.

Al Instituto de Ingeniería del campus Juriquilla de la UNAM, en especial a la Dra. Idania Valdez Vázquez por la donación de la cepa de M. Barkeri para el análisis de qPCR y al Dr. Julián Carrillo Reyes por sus consejos.

A los miembros de mi Comité tutor, el Dr. Pedro Garcés Yépez y el Dr. Luis Alberto Miranda Romero por sus sugerencias, observaciones y planteamientos para el proyecto. Así mismo, por tratar de sacar lo mejor de mí.

A los miembros del jurado, el Dr. Luis Corona Gochi, el Dr. Germán Mendoza, el Dr. Felipe Ruiz y la Dra. Ofelia Mora por la revisión y aporte de sugerencias al trabajo.

Resumen

Méndez Ramírez José Hiram, 2017. Cambios en las poblaciones de bacterias metanogénicas y en la fermentación ruminal de bovinos alimentados bajo diferentes estrategias de alimentación. Tesis de maestría. Tutor: Dr. Ricardo Basurto Gutiérrez. Comité tutorial: Dr. Pedro Garcés Yopez, Dr. Luis Alberto Miranda Romero. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de dos tipos de procesamiento del grano de maíz (molido vs rolado) y la inclusión de monensina sódica en niveles de 0 ó 21 mg por kg de materia seca sobre las poblaciones de *archaeas* metanogénicas y protozoarios, el patrón de fermentación *in vivo* y la producción de gas y metano *in vitro* en ganado bovino. Se usaron 4 novillos de diferentes encastes provistos con cánula en el rumen, alimentados una vez al día con dietas integrales (16 por ciento de PC, 2.6 megacalorías EM por kg) al 1.8 por ciento de su peso vivo en base seca, en un arreglo factorial 2x2, bajo un diseño experimental de cuadrado latino 4x4 de 21 días por periodo. El muestreo de contenido ruminal se realizó entre los días 19 y 21 a las 0, 4 y 8 horas postprandiales. En la prueba *in vivo* los resultados indican que el propionato fue mayor con la combinación monensina y maíz rolado que con monensina y maíz molido, (interacción P x M $p < 0.05$). Ambos factores disminuyeron el número de protozoarios, pero solo la monensina disminuyó el pH del líquido ruminal ($p < 0.05$) y afectó las proporciones molares de AGV, reduciendo el acetato y aumentando el propionato ($p < 0.05$). Ninguno de los factores de estudio afectó la población de *archaeas* metanogénicas o la concentración de amonio ($p > 0.10$). En concordancia con las pruebas *in vivo*, la monensina redujo la producción *in vitro* de gas y metano ($p < 0.01$), interactuando con el procesamiento del maíz en la tasa de digestión ($p < 0.07$), con incremento por la inclusión de monensina y maíz rolado. En conclusión, la disminución de la producción de metano se explica más por cambios en el patrón de la fermentación y en la población de los protozoarios, que por cambios en la población de los microorganismos metanogénicos.

Abstract

Méndez Ramírez José Hiram, 2017. Shifts in the populations of methanogenic bacteria and ruminal fermentation of cattle fed under different feeding strategies. Master of science thesis. Director: Dr. Ricardo Basurto Gutiérrez. Advisors: Dr. Pedro Garcés Yopez, Dr. Luis Alberto Miranda Romero. The objective of this work was to determine the effect of two types of corn grain processing (grinding vs rolling) and the inclusion of sodium monensin at levels of 0 or 21 mg per kg of dry matter on the populations of methanogenic archaea and protozoan, the pattern of fermentation *in vivo* and the production of gas and methane *in vitro* in cattle. 4 crossed steers provided with cannula in the rumen were used and fed once a day with integral diets (16 percent of CP, 2.6 megacalories EM per kg) to 1.8 percent of their live weight on a dry basis, in an array factorial 2x2, under an experimental design of a 4x4 Latin square of 21 days per period. Ruminal content sampling was performed between days 19 and 21 at 0, 4 and 8 postprandial hours. In the *in vivo* test, the results indicate that the propionate was higher with the monensin and rolled corn combination than with monensin and ground corn, (P x M interaction $p < 0.05$). Both factors decreased the number of protozoa, but only monensin decreased the pH of the ruminal fluid ($p < 0.05$) and affected the molar proportions of VFA, reducing acetate and increasing propionate ($p < 0.05$). None of the study factors affected the population of methanogenic archaeas or ammonium concentration ($p > 0.10$). In agreement with the *in vivo* tests, monensin reduced the *in vitro* production of gas and methane ($p < 0.01$), interacting with the processing of corn in the digestion rate ($p < 0.07$), with an increase by the inclusion of monensin and rolled corn. In conclusion, the decrease in methane production is explained more by changes in the pattern of fermentation and in the population of protozoa, than by changes in the population of methanogenic microorganisms.

INDICE GENERAL	
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA	3
FERMENTACIÓN DE LOS NUTRIENTES EN EL RUMEN	3
<i>Digestión y metabolismo de los carbohidratos estructurales y no estructurales en el rumen</i>	3
<i>Metabolismo del nitrógeno en el rumen</i>	6
Importancia de la concentración de amonio en el rumen	7
PRODUCCIÓN DE METANO EN EL RUMEN Y LAS POBLACIONES MICROBIANAS	8
<i>Ecología de la metanogénesis</i>	8
<i>Bioquímica de la metanogénesis</i>	10
<i>Protozoarios y su relación con la producción de metano</i>	12
MANIPULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL PARA LA REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METANO	13
<i>Composición de la dieta y su relación con la producción de metano</i>	14
<i>Efecto del procesamiento de los granos en la producción de metano</i>	16
<i>Procesamiento mecánico para disminución del tamaño de partícula</i>	18
<i>Efecto de la monensina sódica en la producción de metano y en las poblaciones metanogénicas y de protozoarios</i>	18
MÉTODOS BASADOS EN PCR PARA ESTIMAR LAS POBLACIONES METANOGÉNICAS	21
CAPÍTULO III OBJETIVOS	24
CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS	25
EXPERIMENTO 1	25
<i>Determinación del tamaño de partícula del maíz utilizado en las dietas</i>	29
<i>Procedimientos generales de muestreo</i>	30
<i>Determinación del pH</i>	30
<i>Determinación de nitrógeno amoniacal NH₃-N</i>	30
<i>Determinación del patrón de ácidos grasos volátiles (AGV)</i>	32
<i>Cuantificación de las poblaciones de protozoarios ruminales</i>	34
<i>Extracción de ADN y cuantificación del número de archaeas metanogénicas por la técnica de PCR en tiempo real</i>	35
EXPERIMENTO 2	38
<i>Producción in vitro de gas y metano por la técnica de Menke y Staingass</i>	38
<i>Preparación soluciones y tamaño de muestras</i>	38
<i>Preparación del líquido del rumen</i>	38
<i>Medición y almacenamiento del gas generado</i>	38
<i>Cinética de la producción de gas (Sistema automatizado de Ankom)</i>	41

<i>Digestibilidad in vitro de las dietas experimentales</i>	44
<i>Simulación del efecto de la monensina sódica y del procesamiento del grano de maíz en la producción in vivo de metano por novillos</i>	45
<i>Análisis estadístico</i>	46
CAPÍTULO V RESULTADOS	48
EXPERIMENTO 1 PATRON DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y POBLACIONES MICROBIANAS	48
<i>pH</i>	48
<i>Amonio</i>	48
<i>Ácidos grasos volátiles</i>	48
<i>Protozoarios</i>	50
<i>Abundancia de archaeas metanogénicas</i>	50
EXPERIMENTO 2 PRODUCCIÓN IN VITRO DE GAS Y METANO	55
<i>Producción in vitro de gas y metano por la técnica de Menke y Staingass</i>	55
<i>Cinética de producción de gas (CPG) con el sistema de monitoreo de producción de gas AMKOM</i>	55
<i>Digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS)</i>	55
<i>Simulación del efecto de la monensina sódica y del procesamiento del grano de maíz en la producción in vivo de metano por novillos</i>	56
CAPÍTULO VI DISCUSIÓN	63
EXPERIMENTO 1	63
<i>pH del líquido del rumen</i>	63
<i>Concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃)</i>	65
<i>Patrón y concentración de los ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal</i>	67
<i>Conteo de Protozoarios en el líquido ruminal</i>	71
<i>Densidad de las poblaciones de archaeas metanogénicas</i>	72
EXPERIMENTO 2 PRODUCCIÓN IN VITRO DE GAS Y METANO	76
<i>Producción total de Gas</i>	76
<i>Producción in vitro de metano</i>	78
<i>Digestibilidad in vitro de la materia seca</i>	79
<i>Efecto de la inclusión de monensina y grano rolado en la estimación de la producción de metano de novillos alimentados con ensilado de maíz y concentrado</i>	80
CAPITULO VII CONCLUSIONES	84
CAPÍTULO VIII LITERATURA CITADA	86
ANEXOS	103
ANEXO 1 PROGRAMA PARA AJUSTAR EL MODELO NO LINEAL (MONOMOLECULAR) A LOS DATOS DE PRODUCCIÓN DE GAS	103
ANEXO 2. FOTOGRAFÍAS DE PROTOZOARIOS CILIADOS CON LA TINCIÓN DE VERDE BRILLANTE	104
ANEXO 3 FOTOGRAFIA DE GEL PRODUCTO DE REACCIÓN DE QPCR	105

Índice de cuadros

Cuadro 4.1	Programa de actividades de los períodos experimentales.	26
Cuadro 4.2	Composición porcentual de las dietas experimentales.	27
Cuadro 4.3	Composición química calculada de las dietas experimentales.	28
Cuadro 4.4	Análisis de tamaño de partícula del grano de maíz usado en el experimento.	29
Cuadro 4.5	Ecuaciones de calibración para determinar la concentración de los AGV.	33
Cuadro 5.1.	Efecto de la monensina y procesamiento del grano de maíz sobre la fermentación ruminal de novillos y poblaciones microbianas a 0, 4 y 8 h postprandiales.	51
Cuadro 5.2.	Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre el patrón de los ácidos grasos volátiles del líquido del rumen de novillos a 0, 4 y 8 h postprandiales.	52
Cuadro 5.3.	Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la producción <i>in vitro</i> de gas y metano y la DIVMS.	57
Cuadro 5.4.	Efecto de la Monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la cinética de la producción <i>in vitro</i> de gas de acuerdo con el modelo monomolecular.	59
Cuadro 5.5.	Simulación del efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz en la producción de metano por novillos.	62

Índice de figuras

Figura 2.1. Producción de AGV en el rumen.	5
Figura 2.2 Vías de la metanogénesis.	11
Figura 5.1 Efecto del procesamiento del grano de maíz y la inclusión de monensina sódica sobre la proporción molar de propionato a las cuatro horas después de la alimentación.	54
Figura 5.2 Efecto del procesamiento del grano de maíz y la inclusión de monensina sódica sobre la producción de gas <i>in vitro</i> con la técnica de Menke y Staingass.	58
Figura 5.3 Gráfica de producción total de gas (ml/48 h) vs tiempo de acuerdo con el modelo exponencial monomolecular.	60
Figura 5.4 Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la tasa de digestión.	61

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.

La acumulación de los gases llamados “de efecto invernadero” (GEI) en la atmósfera está provocando el fenómeno conocido como *Cambio Climático*, el cual se caracteriza por el incremento de la temperatura global del planeta. Se espera que este fenómeno altere la temperatura, patrones de precipitación, niveles atmosféricos de CO₂ y la disponibilidad de agua, afectando en última instancia la vida en el planeta (Sejian *et al.*, 2015). Las consecuencias del cambio climático son en primera instancia ecológicas, pero se presentan en cascada, lo que finalmente impacta la estabilidad socioeconómica global. Los efectos del cambio climático son la pérdida de los glaciares, inundaciones, y aumento del nivel del mar, entre otros. En lo que se refiere a las actividades agropecuarias, la producción animal se ve afectada debido a alteraciones en los patrones de crecimiento de forrajes y la variación en el ambiente térmico. Estos factores en conjunto pueden afectar la salud, reproducción, eficiencia alimenticia y, finalmente la utilidad y viabilidad económica del sector (Sejian *et al.*, 2015).

El dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) son considerados los principales causantes del efecto invernadero y tienen su origen en dos fuentes: naturales y antropogénicas. Estos gases absorben la radiación infrarroja solar, la cual posteriormente emiten hacia la superficie del planeta incrementando la temperatura (Moss *et al.*, 2000).

Aun cuando que el CO₂ recibe mayor atención como factor de impulso del calentamiento global, la emisión N₂O y CH₄ tiene un impacto significativo e importante para el medio ambiente, debido a que ambos tienen un mayor poder de calentamiento que el primero. Por ejemplo, el CH₄ y N₂O tienen un poder calorífico de 21x y 250x más que el CO₂ respectivamente. Del total de las emisiones antropogénicas en términos de cada gas, a nivel global la agricultura genera el 23% de CO₂, 60% de CH₄ y 80% de N₂O (Moss *et al.*, 2000). En este sentido, esta actividad se encuentra bajo constante desarrollo científico para reducir las emisiones de GEI.

Por su parte la actividad pecuaria tiene un aporte significativo a este problema, debido principalmente a que los rumiantes son considerados emisores importantes de CH₄ entérico, ya que se estimó que la ganadería global aporta 18% del total de las emisiones antropogénicas de CO₂ equivalentes anualmente, colocándola como una seria amenaza al

medio ambiente (FAO, 2006); se ha estimado que los bovinos pueden producir de 50 a 130 kg de metano /animal/año (Minson 1993; IPCC, 2006).

En México, de acuerdo con datos del INECC (Instituto Nacional de Ecología y cambio climático), en 2013 el sector agropecuario mexicano expulsó un total de 80169.09 de Gg de CO₂ equivalentes, lo que significa un 12% de las emisiones totales de GEI a nivel nacional para ese año. De estas emisiones, 51208.14 Gg CO₂ equivalentes (63.88 %), fueron emitidos como metano por la subcategoría fermentación entérica por las especies domésticas. Se concluyó que el ganado carnico y lechero aportan 80.36% y 13.18% respectivamente, mientras que el restante 6.46% corresponde a otras especies domésticas (ovinos, caprinos, caballos, mulas y asnos, cerdos y aves)

Considero importante resaltar el hecho de que, aunque el índice de contaminación por CH₄ mostrado en el párrafo anterior por el ganado cárnico y lechero depende directamente de la cantidad de ejemplares para cada caso, el factor de emisión de metano del ganado lechero es de 100 Kg/animal/año (INECC, 2015). El consumo de alimento es el determinante primario de la producción de metano (Shibata y Terada, 2010); por lo tanto, cuando la eficiencia alimenticia mejora la cantidad de metano excretado por Kg de producción de leche disminuye. Cabe mencionar que en estas condiciones el metano producido en la fermentación representa una pérdida de entre 2 y 12% de la energía bruta consumida (Johnson y Johnson, 1995).

Por otro lado, la composición de la dieta tiene un papel relevante en lo concerniente a la emisión de metano, por lo que es de importancia conocer que factores nutricionales la afectan y la respuesta de las comunidades metanogénicas a dichos factores.

La importancia de este trabajo es obtener información acerca de la respuesta de las comunidades metanogénicas a diferentes estrategias nutricionales y evaluar si la producción de metano en el ganado bovino tiene relación con dicha respuesta para mejorar la eficiencia de producción y disminuir el impacto ecológico de la ganadería lechera.

CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA

Fermentación de los nutrientes en el rumen

Digestión y metabolismo de los carbohidratos estructurales y no estructurales en el rumen

La descomposición anaeróbica de la materia orgánica (MO) a CH₄ y CO₂ es un proceso microbiano complejo que requiere la cooperación o interdependencia de bacterias fermentativas anaeróbicas y *archaeas* metanogénicas. Las bacterias del rumen hidrolizan y fermentan los polímeros y compuestos de la MO. Durante la degradación ocurren reacciones de conservación de energía. Sin embargo, debido a la ausencia de oxígeno, por cada molécula de glucosa metabolizada, solo hay una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos NADH.

En general, en las dietas para rumiantes los carbohidratos constituyen entre el 70 y 80% de la materia seca (MS), y se clasifican en carbohidratos estructurales, la cual es una fracción constituida por las paredes celulares (celulosa, hemicelulosa y lignina); y en carbohidratos no estructurales, que son el almidón, fructanos, y ácidos orgánicos (Hall, 2014). La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y se ha estimado que 7.5x10¹⁰ toneladas son sintetizadas anualmente a través de los procesos fotosintéticos (Carere *et al.*, 2008). Además, la celulosa es el componente primario de las paredes celulares de las plantas. Sin embargo, los animales superiores no secretan enzimas digestivas que puedan digerir la celulosa, por lo que dependen de las enzimas microbianas. La digestión pre-gástrica se desarrolló desde hace aproximadamente 35 millones de años, lo que les permitió a los rumiantes ocupar un nicho ecológico muy amplio (Pérez-Barberia *et al.*, 2004). En el rumen, a diferencia de otros hábitats, la digestión de la celulosa y otros compuestos unidos con enlaces β1 (hemicelulosa, fructosanos, pectina) se realiza en mayor medida por unas cuantas especies de bacterias que se adhieren directamente a la superficie de las fibras (Weimer, 1998). Los científicos están de acuerdo en que la principal actividad celulolítica proviene de bacterias primarias, en particular *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*, aunque también se reconoce que hay otros microorganismos (hongos, protozoarios, bacterias no especializadas) secundarios que tienen un papel en el proceso (Weimer, 1996). La principal

característica que comparten las especies celulolíticas primarias es su especialización para la digestión de la celulosa y el uso eficiente de los productos de esta hidrólisis como sustratos para el crecimiento, lo que les da una ventaja para su selección con animales que están consumiendo dietas altas en forrajes (Weimer, 1996).

El mecanismo de hidrólisis de la celulosa en la digestión fermentativa se basa en complejos multi-enzimáticos conocidos como celulosomas, los cuales están constituidos de 18 a 20 proteínas localizadas en la membrana celular facilitando la unión y la degradación de la microfibrilla de celulosa por las bacterias.

Este mecanismo además de facilitar la hidrólisis de la celulosa y el acceso a los productos hidrolíticos permite a las bacterias adherirse al sustrato evitando que sean predadas por protozoarios o sean arrastradas lejos de las fibras de celulosa (Church, 1988). Las bacterias celulolíticas primarias (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus*) digieren la celulosa a tasas entre 0.05 a 0.1 % h⁻¹, más rápido que cualquier otra especie celulolítica conocida (Weimer, 1998). Aunque la digestión de la celulosa está determinada por las características y propiedades fisicoquímicas de las paredes celulares (Van Soest, 1994) la evidencia indica que la cinética de la digestión es de primer orden, es decir, depende de la concentración de celulosa o de la superficie disponible para el ataque microbiano, y no por el número de microorganismos presentes (Weimer, 1998).

Para que los animales logren obtener altos niveles de eficiencia en sistemas de producción intensivos es necesario el uso de granos de cereal por su alto contenido de energía en forma de almidón. El almidón puede constituir hasta 80% de la MS de los granos y debido a su alto costo es necesario maximizar su utilización en el rumen. En el ganado lechero el almidón puede constituir entre el 20 a 28% en base MS (Allen y Piantoni, 2014). Químicamente el almidón es un polisacárido que se compone de polímeros de glucosa unida covalentemente con enlaces α 1-4 (Amilosa) y α 1-6 (Amilopectina). Entre los factores que afectan la degradabilidad ruminal del almidón se pueden mencionar el tipo de grano (maíz, trigo, cebada, sorgo); procesamiento (molido, rolado, hojueleado con vapor); método de conservación (seco, ensilado); relación de amilosa y amilopectina; tipo de endospermo (vitreo *versus* harinoso); nivel de consumo; relación F:C (Por el efecto de llenado del rumen); edad de los animales, especie, población microbiana, tamaño de partícula (Allen y Piantoni, 2014).

Sin importar los polisacáridos que son hidrolizados en el rumen, se liberan monosacáridos y oligosacáridos de 3 a 10 unidades de glucosa, que es captada por los microorganismos y dirigida a la glucólisis (Embden Meyerhof), y las bacterias obtienen ATP, NADH+H y piruvato, que es subsecuentemente reducido a acetato, propionato y butirato, como se muestra en la siguiente ilustración:

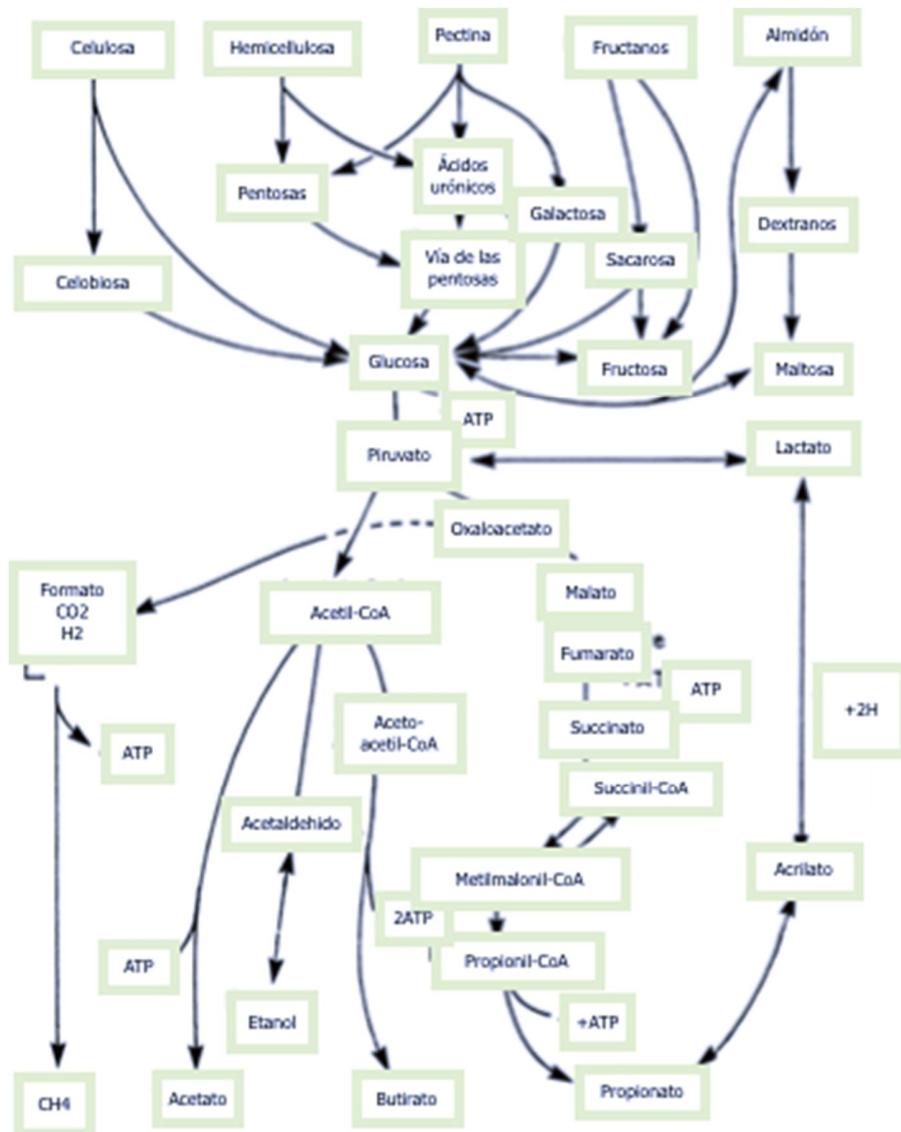


Figura 2.1: Producción de AGV en el rumen. Se muestran las rutas generales para la fermentación de los carbohidratos a ácidos grasos de cadena corta en las bacterias fermentativas primarias. Modificado de Stevens y Hume (1998).

Considerando los elementos anteriores, se concluye que los factores de proporción en la alimentación, así como el nivel de consumo afectan la cinética ruminal, y esto en consecuencia determina la composición de las poblaciones de microorganismos en el rumen. Es decir, las dietas constituidas principalmente por forrajes tienen una buena cantidad de celulosa, son intermedias en azúcares solubles y bajas en almidón. Con este tipo de dieta, los microorganismos celulolíticos y sacarolíticos son los más abundantes y el patrón de fermentación se caracteriza por una mayor proporción de acetato y butirato. Por otro lado, con dietas que contienen elevada cantidad de almidón, como por ejemplo en dietas de finalización, la población microbiana del rumen está constituida principalmente por bacterias amilolíticas. Estas compiten por los carbohidratos solubles y productos de la hidrólisis del almidón, especialmente cuando el pH es bajo, produciendo grandes cantidades de propionato y lactato (Church, 1988).

En la parte final de la degradación de los carbohidratos, las *archaeas* metanogénicas utilizan como precursores acetato, formiato y CO₂ como los aceptores finales de electrones que son aportados por el hidrógeno (H₂) disuelto completando la degradación de la MO, siendo el producto final el CH₄.

Metabolismo del nitrógeno en el rumen

El nitrógeno es un elemento crítico para los animales ya que es el componente clave de la proteína (aminoácidos). En nutrición proteica de rumiantes se consideran dos sistemas biológicos que coexisten en una interacción simbiótica y cada uno tiene requerimientos nutricionales específicos. El sistema microbiano puede utilizar amonio y en menor grado aminoácidos para el mantenimiento y crecimiento. El sistema animal, por su parte, depende enteramente de los aminoácidos suministrados por la proteína de origen microbiano y la proteína de sobrepaso.

La proteína microbiana constituye la principal fuente de aminoácidos que llegan al intestino y provee entre 50 y 80% de la proteína absorbida en los animales rumiantes (Bach *et al.*, 2005). Varios factores influyen en la cantidad de proteína que fluye al intestino como

es la energía disponible para el crecimiento microbiano, la eficiencia del crecimiento microbiano, la cantidad de proteína consumida, los contenidos de proteína susceptible a ser degradada en el rumen y aquella que es resistente al ataque microbiano pero digestible en el intestino y el pH del rumen que altera la degradación de la proteína (NRC, 1985). En los actuales sistemas de alimentación se debe establecer la relación proteína energía con la finalidad de llenar los requerimientos tanto del animal como de los microorganismos del rumen (Clark *et al.*, 1992), sin olvidar que la proteína es uno de los nutrientes más caros para la alimentación animal y buscar maximizar la retención de nitrógeno por los animales.

Importancia de la concentración de amonio en el rumen

Hasta el 80 % de las bacterias ruminales pueden utilizar el amonio como única fuente de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana. El amonio es el metabolito común de la degradación de la proteína dietética, la proteína microbiana y los compuestos nitrogenados no proteicos (NNP). Una gran parte de la proteína dietética se hidroliza a péptidos y aminoácidos por parte de las enzimas microbianas. Estos pueden ser incorporados directamente a la proteína microbiana o bien desaminados para mantener esqueletos de carbón para la producción de energía. El amonio puede ser excretado o en algunos casos reutilizado para la síntesis *de novo* de aminoácidos requeridos por las bacterias.

La concentración óptima de amonio ruminal que se requiere para el máximo crecimiento microbiano no está bien establecida. La cantidad de amonio que puede ser captada por las bacterias dependerá de la tasa de crecimiento, aunque esto último está determinado por la cantidad de energía disponible. Satter y Slyter (1974) reportan que la concentración mínima promedio de amonio para lograr la máxima eficiencia de crecimiento microbiano es de 5 mg NH₃-N/100 ml, aunque reconocen que el límite podría rondar los 20 mg NH₃-N/100 ml; Van Soest (1994) menciona que la concentración óptima podría ser 10 mg NH₃-N/100 ml. Sin embargo, hay otros factores que pueden afectar el nivel óptimo, como son: el nivel de consumo, la solubilidad de la proteína dietética y la disponibilidad y tasa de fermentación de los carbohidratos. Una vez que las bacterias han alcanzado su máximo crecimiento determinado por la energía disponible, el amonio comienza a acumularse en el líquido ruminal.

El amonio en exceso es absorbido a través del epitelio del rumen, y conducido al hígado donde es convertido en urea (Basurto, 1995). Una fracción de la urea es reciclada

al rumen a través de la saliva o de la pared ruminal donde la ureasa de las bacterias adheridas a la pared del rumen desempeña un papel importante en el reciclaje; sin embargo, una cantidad significativa de urea es excretada a través de la orina. De acuerdo a Leng (1993), se sugiere que incrementar la eficiencia del crecimiento microbiano en el rumen podría reflejarse en una menor producción de CH₄, ya que una mayor cantidad de la MO fermentada aparece como MO microbiana y no como ácidos grasos volátiles u otros productos de la fermentación.

Producción de metano en el rumen y las poblaciones microbianas

Ecología de la metanogénesis

La metanogénesis es la reducción del CO₂ o moléculas orgánicas (*ej*: metanol, metilaminas, formato o acetato) a CH₄, utilizando el gas hidrógeno (H₂) como donador de electrones (Wünschiers *et al.*, 2013).

El metano es producido por microorganismos pertenecientes al dominio *archaea*, que comprende 2 reinos: *Euryarchaeota* (metanogénicos, halófilos extremos, y algunos hipertermófilos) y *Crenarchaeota*. Las *archaeas* metanogénicas son un grupo filogenéticamente diverso de estrictamente anaeróbicos y cuenta con cinco órdenes bien establecidos: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*, con 31 géneros (Hedderich y Whitman, 2013). Pueden utilizar diversos tipos de sustratos orgánicos y de aceptores electrónicos (CO₂, nitratos, sulfatos) y crecen en forma óptima en un rango de pH entre 6 y 8, alta salinidad y medios con un alto potencial redox < -300mv. Las *archaeas* metanogénicas son el único grupo microbiano que acopla la producción de metano con la generación de energía (Sirohi *et al.*, 2010). Estas características les permiten sobrevivir en una gran cantidad de ambientes anaeróbicos tales como pantanos, intestinos de termitas, aguas residuales y en el rumen. No obstante, son microorganismos que tienen requerimientos nutricionales muy específicos y su aislamiento no ha sido fácil de realizar en condiciones de laboratorio (Zhou *et al.*, 2011).

En los ambientes anaeróbicos, la cadena alimenticia inicia con la degradación de los polímeros, como la celulosa, por microorganismos fermentadores primarios tales como las bacterias celulolíticas. En la degradación de los polímeros se liberan monómeros de glucosa por fermentadores primarios; ésta es posteriormente metabolizada a CO₂, H₂, lactato, ácidos grasos volátiles principalmente acetato, propionato y butirato o alcoholes por

este grupo de fermentadores primarios y por fermentadores secundarios que no tienen capacidad para degradar polímeros complejos. Las *archaeas* utilizan el H₂ y CO₂ resultante en reacciones de conservación de energía (Morgavi *et al.*, 2010). Es decir, la metanogénesis es el paso final de la degradación de la MO en ambientes anaeróbicos, donde el H₂ dona sus electrones para la reducción del CO₂ a CH₄ (Thauer *et al.*, 2008; Hedderich y Whitman, 2013).

Existen otros grupos de bacterias reductoras de sulfato o de nitratos y las acetogénicas que compiten con las *archaeas* metanogénicas por el H₂ disuelto. Aunque las primeras tienen la ventaja de tener una constante de Michaelis (k_m) (2 μM) más bajo para la captación del hidrógeno que el k_m (8 μM) de las metanogénicas, en ambientes como el rumen la baja disponibilidad de estos sustratos impide que las bacterias reductoras sean seleccionadas. Por esta razón los micro-organismos metanogénicos predominan en el ambiente ruminal (Thauer *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2008).

Las bacterias acetogénicas podrían competir con las metanogénicas por el H₂ disuelto en el rumen, sin embargo, en condiciones normales la acetogénesis difícilmente ocurre debido a que la presión parcial de hidrógeno es menor que el umbral requerido por los microorganismos acetogénicos (Ellis *et al.*, 2008). Además, la actividad de los microorganismos metanogénicos contribuye a mantener la presión de H₂ baja, por lo que los acetogénicos no son capaces de competir efectivamente por el H₂. Es importante considerar que la acumulación de H₂ inhibiría el funcionamiento normal de las enzimas microbianas involucradas en las reacciones de transferencia de electrones, particularmente de la enzima NADH deshidrogenasa. Es decir, que un exceso de H₂ puede agotar el NAD oxidado, por lo que la oxidación de la MO puede afectarse, deteniendo las reacciones de transferencia de energía (Morgavi *et al.*, 2010). Esta interacción inter-metabólica entre los microorganismos productores y consumidores de H₂ (metanogénicas) es conocida como transferencia inter-especies de H₂ y es una relación simbiótica, que permite maximizar la degradación de la MO en condiciones anaeróbicas. Por esta razón la formación de CH₄ es algo inherente para la fermentación ruminal por lo que el objetivo disminuirla y no eliminarla por completo.

Dependiendo de la dieta, la formación de acetato y butirato en el rumen resulta en la producción de gas hidrógeno (H₂) y en contraste, la formación del propionato sirve como

una poza alternativa para la captación del H₂ que resultaría en una reducción en la producción total de CH₄ (Moss *et al.*, 2000).

Bioquímica de la metanogénesis

Como ha sido descrito, la metanogénesis es un tipo de respiración anaeróbica con tres diferentes vías para la formación de metano que dependen del sustrato a reducir. En la primera vía el CO₂ sirve tanto como fuente de carbono como el aceptor de electrones; la segunda vía ó metilotrónica es donde se da la reducción de un grupo metilo o compuestos que contienen un radical metilo y; la vía acetotrónica, también llamada reacción acetoclástica, la cual es la fragmentación del acetato en CH₄ y CO₂. Si la vía acetoclástica fuera importante en el rumen, el aporte de acetato para el animal rumiante podría reducirse; afortunadamente las metanogénicas que utilizan esta vía crecen lentamente en el ambiente ruminal y desaparecen rápidamente del rumen (Thauer *et al.*, 2008; Kim 2012). Es probable que este tipo de *archaeas* crezcan en otros ambientes, como en digestores donde el recambio de líquido es muy lento.

En un ambiente con varios sustratos disponibles, ocurrirá con mayor frecuencia la reacción que energéticamente sea más favorable, es decir la que libere la mayor cantidad de energía libre; en el rumen esta reacción sería la que involucra al H₂ como donador de electrones (Ellis *et al.*, 2008). A continuación, se presenta la forma condensada de la reacción desde el CO₂ y el H₂



Debido a que la concentración de H₂ es muy baja (1-10 Pa) y la $\Delta G'_0$ de la reacción se hace menos negativa (entre -40 y -17 kJ por mol de CO₂) hay una disminución de la energía libre y ello solo permite la generación de <1 mol de ATP por mol de CH₄ producido (Wünschiers *et al.*, 2013). Por esta razón la tasa de crecimiento de los metanogénicos es baja.

Los electrones para la reducción provienen de enzimas hidrogenasas que están ancladas a la pared celular. Las hidrogenasas son enzimas que catalizan la oxidación reversible del hidrógeno molecular (Vignais *et al.*, 2001), y son enzimas esenciales para las metanogénicas, lo cual está reflejado en la presencia de 5 diferentes tipos de metaloenzimas hidrogenasas en estos organismos. Cuatro de estas enzimas son (Ni-Fe)

hidrogenasas, y una hidrogenasa sin grupo prostético hierro-sulfuro (sitio activo), la cual solo ha sido encontrada en *archaeas* metanogénicas (Hedderich y Whitman, 2013).

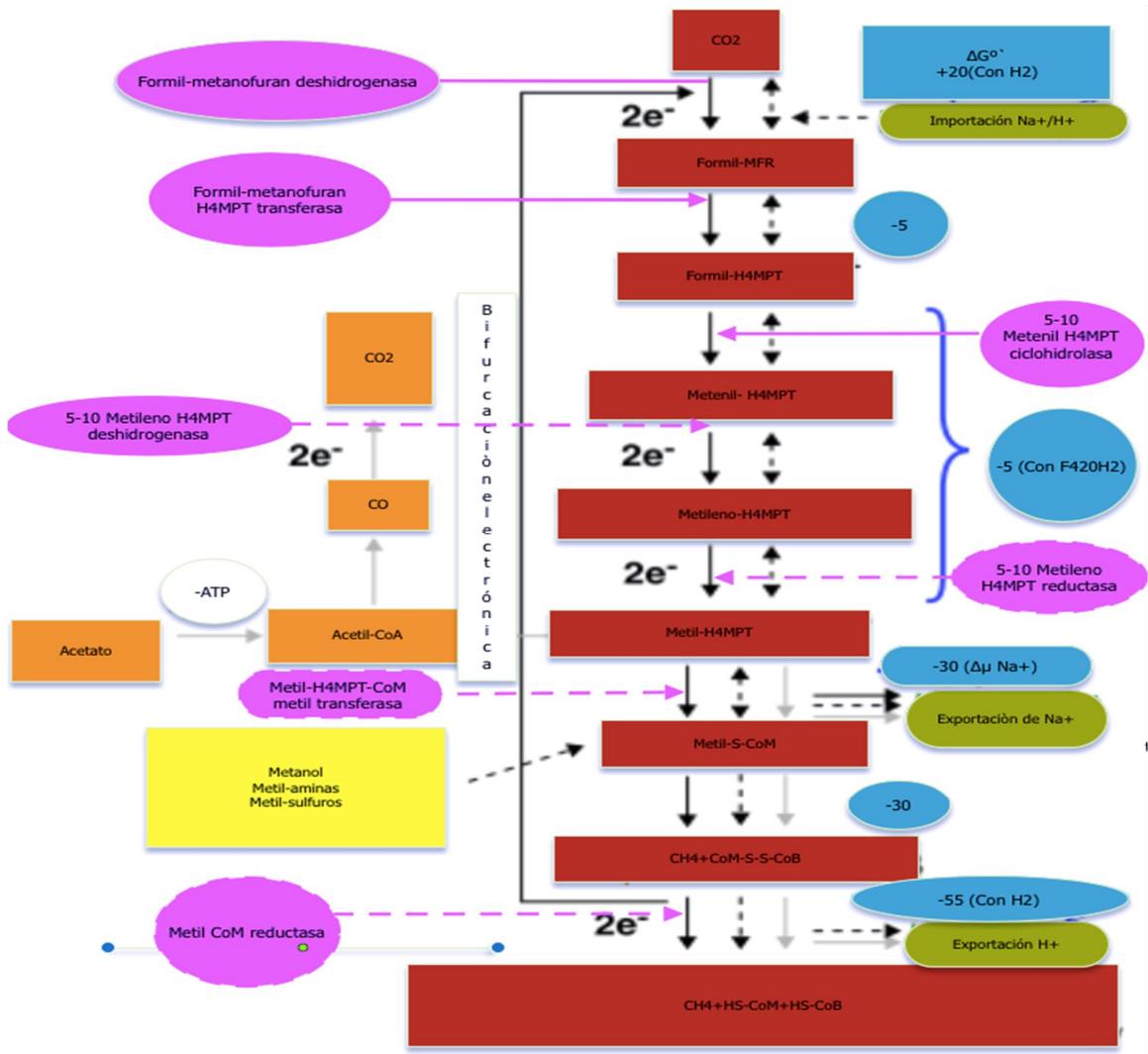


Figura 2.2 Vías de la metanogénesis. Se muestra el sentido de las reacciones de las vías hidrogenotrófica (línea sólida negra), metilotrófica (Línea negra punteada), y acetilclástica (líneas grises). Los cuadros en rojo muestran los intermediarios de la vía hidrogenotrófica. En la vía metilotrófica cuatro compuestos metilados (Cuadro amarillo) entran al nivel de metil-S-CoM y uno es oxidado para generar los electrones para la reducción de los otros tres. En la reacción acetilclástica (Cuadro naranja) el carbono metilo del acetato entra al nivel de metil-H₄MPT y es reducido a metano usando electrones de la oxidación del carbono del grupo carbonilo. Las tres vías tienen como denominador común la reducción de Metil-CoM a metano por la metil-CoM reductasa. Las enzimas principales de la vía hidrogenotrófica se listan en los cuadros morados. El número de electrones transferidos en cada reacción redox se lista junto a las flechas apropiadas. Los cuadros en azul contienen la producción de energía de cada reacción (ΔG° , kJ/ mol). Abreviaturas: MFR, metanofuran; H₄MPT, tetrahidrometanopterina; HS-CoM, coenzima M; HS-CoB, coenzima B; F₄₂₀H₂, forma reducida de la coenzima acarreadora de electrones F₄₂₀. Figura modificada de Costa y Leigh (2014).

Protozoarios y su relación con la producción de metano

Se sabe que los protozoarios y las *archaeas* metanogénicas tienen una relación simbiótica, especialmente en lo que se refiere a la transferencia inter-especies de H₂. El número de protozoarios oscila entre 10⁴ y 10⁶ células por ml de líquido ruminal y pueden representar hasta el 50 % de la masa microbiana en el rumen (Abrar *et al.*, 2016). Los protozoarios ciliados son el grupo más abundante del rumen y se dividen en dos grupos: holotriquios y entodiniomorfos. Son potentes productores de H₂, formato y CO₂, los cuales son productos finales de la hidrólisis de almidones, azúcares y fibra (Ellis *et al.*, 2008). Los protozoarios *Entodinium*, *Polyplaston*, *Epidinium* y *Ophryoscolex* son los que más comúnmente se asocian con las metanogénicas *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* (Hook *et al.*, 2010; Ushida, 2010). En contraste, Kim (2012) menciona a los géneros *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* como los más fuertemente asociados con protozoarios. Un tercer grupo de metanogénicas denominado *rumen cluster C* es también asociado, sin embargo, permanece sin ser cultivado.

Hablando de la relación entre protozoarios y metanogénicas, se ha descrito que esta puede darse en forma de episimbiosis o endosimbiosis (Ushida, 2010). En la primera las metanogénicas se observan adheridas a la superficie celular de los protozoarios. En contraste, en la endosimbiosis las metanogénicas están en el citosol de los protozoarios. En cualquiera de estos tipos de relación hay un beneficio basado en la transferencia inter-especies de H₂, es decir, los protozoarios suministran continuamente H₂ a las metanogénicas para su metabolismo energético y la remoción del H₂ permite que continúe la fermentación de los polímeros en los protozoarios. El número de *archaeas* metanogénicas asociadas con los protozoarios, ya sea en la superficie o en el citosol parece ser regulado parcialmente por la presión parcial de H₂ en el rumen. Las metanogénicas tienden a vivir libres durante las primeras horas postprandiales cuando la presión parcial de H₂ es más alta. En contraste, cuando la presión de H₂ es baja el número de los metanogenos asociados con los protozoarios se incrementa. Tokura *et al.* (1997) reportó que el número de metanogénicas por ciliado oscila alrededor de 10⁴ entre una y dos horas después de la alimentación.

La presencia de protozoarios se ha relacionado con una mayor digestión de la fibra y mayor producción de metano. La disminución de las emisiones de CH₄ en los animales defaunados podría estar relacionada con varios cambios provocados en el patrón de

fermentación por la ausencia de protozoarios. En animales defaunados, se ha observado una menor digestibilidad de la fibra la cual está asociada a una menor proporción molar de acetato y además una menor relación Ac:Pr (Nozière *et al.*, 2011). Este cambio resultaría en la disminución de la producción de CH₄ por la menor disponibilidad de H₂ como sustrato para la metanogénesis. Así mismo, Hegarty (1999) menciona que las menores emisiones de CH₄ en animales defaunados serían debido a la disminución de la digestibilidad de la MS en el rumen y a la disminución de la población de *archaeas* metanogénicas. En un estudio con novillas Brahman (Nguyen *et al.*, 2016), se evaluó el efecto de la defaunación y la adición de nitratos en el rumen sobre la fermentación y la producción de CH₄ *in vitro*, concluyendo que la producción de CH₄ se correlacionó positivamente con el número de protozoarios en el líquido ruminal durante la fase de refaunación. En otros estudios de revisión (Morgavi *et al.*, 2010; Newbold *et al.*, 2015) se concluyó que la defaunación disminuye la producción de CH₄ en 13 y 11 % respecto a los animales faunados. Sin embargo, hay otros trabajos que no han detectado efecto significativo de la defaunación sobre la producción de CH₄ (Ranilla *et al.*, 2007; Hegarty *et al.*, 2008). Se sugiere que la contribución de los diferentes grupos de protozoarios a la metanogénesis puede variar en función del tipo de dieta y adicionalmente, que la población remanente de metanogénicas puede crecer después de pasar un tiempo de la defaunación para compensar por la pérdida de metanogénicas simbiotes. Se concluye entonces que existe variabilidad en el número de protozoarios, pero se establece el hecho de su existencia e importancia en el proceso de metanogénesis.

Manipulación de la fermentación ruminal para la reducción de la producción de metano

La manipulación de la fermentación ruminal tiene como objetivo la optimización los procesos benéficos y la atención de los que son ineficientes o dañinos. Se debe tomar en cuenta el tipo y nivel de alimentación, así como los objetivos del sistema de producción. Algunos procesos que se busca maximizar son: la fermentación de la MO en el rumen, la digestión de la fibra, la producción de proteína microbiana. Por otro lado, se busca disminuir la producción de lactato, el uso de proteína verdadera para el crecimiento microbiano, la absorción de amonio a nivel de rumen y la producción de CH₄ (Nagaraja *et al.*, 1997).

En este respecto, las estrategias para la mitigación de las emisiones de CH₄ pueden ser clasificadas en tres categorías de acuerdo con Knapp *et al.* (2014):

- 1.- Alimentos, manejo de la alimentación y nutrición.
- 2.- Modificadores de la fermentación ruminal.
- 3.- Selección genética y otras prácticas de manejo.

Composición de la dieta y su relación con la producción de metano

La composición de la dieta es uno de los principales factores que influyen en la fermentación ruminal y, en consecuencia, en la producción de metano (Bergen y Yokoyama, 1977). Las modificaciones dietéticas constituyen una de las principales opciones a corto plazo para la disminución de las emisiones, y ejercen su efecto alterando diversos parámetros de la fermentación que a su vez tienen impacto sobre la metanogénesis. Dichas modificaciones pueden causar disminución de la fermentación del alimento, cambios en el sitio de digestión, cambios en el pH, o cambios en otras poblaciones microbianas, entre otros que pueden conducir a la disminución de la disponibilidad de H₂ para las metanogénicas. Por ejemplo, las dietas altas en forraje favorecen una fermentación de tipo acético que impulsa la producción de CH₄ porque se libera H₂ durante la síntesis de este ácido. No obstante alimentos con fibra altamente digestible, por ejemplo, la pulpa de remolacha o la cascarilla de soya, no incrementan las emisiones de CH₄ como podría esperarse con otros ingredientes fibrosos como pastos o forrajes de baja calidad. Por otra parte, las dietas altas en granos promueven la producción de más propionato debido a la presencia de bacterias amilolíticas que sintetizan propionato mediante las vías del succinato y acrilato, incrementando de este modo la proporción molar de este ácido. La síntesis de propionato es un captador de H₂ en el rumen que compite con la metanogénesis, por lo que las dietas que favorecen una baja relación acetato: propionato generalmente reducen las emisiones de metano. Las menores emisiones de CH₄ en animales alimentados con nivel alto de concentrado también pueden explicarse por la disminución del pH y del número de protozoarios (Martin *et al.*, 2009). Los bajos pH observados (<6.0) en animales con dietas altas en concentrados inhiben directamente a los metanogénicos (Van kessel y Russel, 1996) y adicionalmente, el efecto sobre las bacterias celulolíticas (Weimer, 1998), podría reducir la digestión de la fibra limitando la disponibilidad de H₂.

En los sistemas intensivos de producción de carne las relaciones pueden incluir hasta 90% de concentrado. Sauvant y Ginger Reverdin (2007) (citado por Martin *et al.*, 2009) mencionan que la relación entre la proporción de concentrado y las emisiones de CH₄ es curvilínea, con las pérdidas de CH₄ siendo relativamente constantes en dietas conteniendo entre 30 a 40% de concentrado, donde el CH₄ constituye entre 6 a-7 % de la energía bruta consumida. El porcentaje de CH₄ disminuye hasta niveles de entre 2-3% en animales consumiendo dietas con niveles entre 80 y 90% de concentrado que son la dieta típica para ganado de carne en finalización (Lovett *et al.*, 2003; Beauchemin y McGinn 2005).

En contraste, las dietas para ganado lechero deben contener entre 40 al 60% de forrajes, principalmente para no afectar el contenido de grasa de la leche y evitar desórdenes digestivos como acidosis ruminal o desplazamiento de abomaso. Debido a que las vacas lecheras consumen entre 18 a 25 kg de MS al día y al alto porcentaje de forraje en la dieta, se estima que pueden producir entre unos 250 a 600 litros de CH₄ al día lo que equivale a una pérdida de entre 6 a 10 % de la energía bruta consumida (Moe y Tyrrel 1979; Sauer *et al.*, 1998).

Mención especial es el uso de ensilados de maíz como mitigadores de las emisiones de CH₄ (Mills *et al.*, 2008; Beauchemin *et al.*, 2008), en vez de pastos ensilados o henificados. De acuerdo con Beauchemin *et al.* (2008), el efecto mitigador de los ensilados se puede explicar mediante tres mecanismos

- 1) El almidón del grano sin fermentar en el silo favorecería la producción de propionato, en vez de la de acetato en el rumen.
- 2) El incremento del consumo voluntario por la inclusión del ensilado de maíz se traduce en una disminución del tiempo de residencia del alimento, restringiendo la fermentación ruminal y, a su vez, se aumenta el sobrepaso de almidón.
- 3) Cuando el silo de maíz reemplazó el silo de pasto en la dieta, hubo incremento del consumo de MS y mejoró el desempeño productivo de los animales (mayor producción de leche) lo que podría disminuir las emisiones de CH₄ por unidad de producto animal.

Efecto del procesamiento de los granos en la producción de metano

Una de las estrategias nutricionales ampliamente utilizada es el procesamiento de los granos, el cual tiene como objetivo primario aumentar la disponibilidad del almidón, ya sea a nivel ruminal y/o pos-ruminal. En general, los métodos de procesamiento consisten desde la disminución del tamaño de la partícula (molido, quebrado) a otros que además de disminuir el tamaño de la partícula, alteran la matriz proteica o estructura del almidón mediante el uso de calor húmedo (rolado húmedo u hojueado) (Theurer *et al.*, 1999).

Como ha sido mencionado, el efecto del procesamiento de los granos es el incremento de la extensión de la fermentación del almidón en el rumen y, en consecuencia, la reducción de la cantidad de almidón que escapa al intestino (Knapp *et al.*, 2014). Considerando la capacidad limitada para la absorción de glucosa en el intestino de los rumiantes, el uso del almidón es más eficiente cuando se fermenta en el rumen¹. Si bien el procesamiento mejora el uso de los granos desde el punto de vista económico, ya que una menor cantidad de almidón aparece en las heces reduciendo las necesidades de granos, se debe considerar que el procesamiento de los granos puede resultar en excesiva y rápida fermentación del almidón que puede dar origen a trastornos como acidosis ruminal, desplazamiento de abomaso o reducción del consumo y la digestibilidad total (Owens, 2005). Firkins *et al.* (2001) reportaron que el incremento de la digestibilidad total en todo el tracto digestivo del almidón del grano de maíz por el tratamiento con vapor fue aproximadamente 6%, lo que resultó en un incremento en la producción de leche en vacas con consumo de alimento similar, lo cual puede ser explicado porque el procesamiento incrementó la fermentación de la MO en el rumen, lo que se traduce en una mayor producción de AGV totales con una mayor proporción de propionato y finalmente, en mayor cantidad de energía metabolizable para el animal.

El cambio en la tasa y extensión de la digestión del almidón de los granos procesados afecta la fermentación y las poblaciones microbianas en el rumen. Por ejemplo, una reducción importante del pH del rumen afecta a las bacterias celulolíticas, pero otras poblaciones (v.g. protozoarios o metanogénicas) podrían ser también afectadas. De acuerdo con Hristov *et al.* (2013), el procesamiento de los granos puede ser una práctica

¹ Comunicación personal Dr. Tom Tylutky, PhD, CEO AMTS LLC en el seminario "Advanced formulation and NDF explained"

efectiva para mitigar las emisiones de CH₄, especialmente cuando se considera la producción relativa de CH₄, es decir, la producción de CH₄ por unidad de producto animal (leche, kg carne). Knapp *et al.* (2014), sugieren que la reducción relativa del CH₄ se puede explicar por la disminución de la velocidad de la tasa de pasaje ruminal de las partículas de grano tratadas, los incrementos en la producción total de AGV y de la proporción de propionato, así como el aumento en el consumo de MS digestible.

En términos absolutos, el procesamiento de los granos incrementa la producción de CH₄ y mejora la eficiencia del crecimiento microbiano. Que la producción total de CH₄ se incremente, se explica porque una mayor cantidad de MO es fermentada en el rumen. Aunque, por otro lado, Leng (1993) sugiere que según aumenta la eficiencia del crecimiento microbiano, la cantidad de MO fermentable aparece como MO microbiana y se reduce la MO que es transformada en AGV por lo que en consecuencia, disminuiría la producción de CH₄. Esto sugiere que la fermentabilidad de la MO es mayor de lo que las bacterias pueden incorporar a su masa.

En ganado de carne, también se han observado efectos benéficos en el comportamiento animal aplicando procesamiento a los granos. Yang *et al.* (2012) evaluaron el procesamiento de precisión del grano de cebada para la finalización de ganado de carne. El procesamiento mejoró el consumo de alimento, la digestibilidad y la eficiencia alimenticia. Los autores (Yang *et al.*, 2012), estimaron que los animales alimentados con cebada tratada con el procesamiento de precisión estarían en corral 25 días menos y se ahorrarían 163 Kg de alimento por animal. En términos de producción de CH₄, menos alimento se fermentó en el rumen, lo cual debe significar una menor cantidad de CH₄ por animal y por unidad de producción.

En otro estudio conducido con novillos en cámaras de respiración (Hales *et al.*, 2012), se evaluó el efecto del procesamiento del grano de maíz y la inclusión de WDGS (grano húmedo de destilería) sobre el metabolismo energético, y también el balance de nitrógeno y pérdidas de CH₄ entérico de novillos Jersey en finalización alimentados con dietas con 73% de maíz, en el que además también se redujo la producción de CH₄.

Procesamiento mecánico para disminución del tamaño de partícula

Entre los principales métodos de procesamiento del maíz utilizados para alimentación del ganado están los que involucran reducción en el tamaño de partícula, de los cuales los más populares son el molido y el rolado (con o sin la adición de agua y vapor). Para el procesamiento molido se requiere el uso de un molino de martillos el cual reduce el tamaño del grano hasta que es suficientemente fino para pasar a través de una criba, en la que el maíz alcanza un tamaño de partícula fina (Richards y Hicks, 2007) y obtener la máxima digestión total en todo el tracto digestivo. Las partículas que son más grandes y permiten menor entrada de agua resistirán más el ataque de los microbios en el rumen y de las enzimas en el intestino (Owens, 2005). En contraste, el maíz rolado en seco es procesado en un molino de rodillos y su tamaño de partícula es mayor (Richards y Hicks, 2007), pero su digestibilidad podría ser mayor que la del maíz molido debido a que la extensión de la digestión es mayor para híbridos de maíz que contienen más endospermo harinoso cuando el procesamiento es rolado en comparación con híbridos que tienen mayor proporción de endospermo vitreo (Zinn *et al.*, 2011).

En este sentido, el procesamiento del maíz con ambos métodos modifica la degradabilidad de los granos en el rumen ya sea cambiando la tasa de digestión o cambiando la distribución de la materia seca del grano sobre las diferentes fracciones (soluble, potencialmente degradable o no degradable). En consecuencia, esto puede resultar en cambios de las poblaciones microbianas, especialmente en las metanogénicas o de protozoarios que podrían resultar en la disminución de las emisiones de CH₄.

En general, se puede decir que los efectos del procesamiento de los granos son consistentes sobre la fermentación ruminal y el comportamiento animal, pero se requieren más estudios sobre su efecto en la producción de CH₄, en los cambios en las poblaciones metanogénicas del rumen y su posible interacción con otros medios para manipular la fermentación ruminal.

Efecto de la monensina sódica en la producción de metano y en las poblaciones metanogénicas y de protozoarios

La monensina sódica es un antibiótico producido por el hongo *Streptomyces cinnamonensis* y es utilizada para mejorar la eficiencia alimenticia, ganancia de peso y la producción de leche (Bergen y Bates 1984; Sauer *et al.*, 1998). Recientemente, se ha renovado el interés

en la monensina como estrategia para la mitigación de la producción de CH₄ entérico, ya que se sabe que inhibe microorganismos gram-positivos y protozoarios, que son de los principales microorganismos productores de gas H₂ en el rumen, el cual es utilizado como sustrato por las *archaeas* metanogénicas. (Bergen y Bates, 1984).

No es claro como la monensina altera la producción de CH₄, ya que esta no inhibe directamente a los microorganismos metanogénicos (Weimer *et al.*, 2008; Hook *et al.*, 2009), pero se ha sugerido que la mitigación del CH₄ podría explicarse por la inhibición de bacterias y protozoarios productores de gas H₂.

Los resultados de Van Nevel y Demeyer (1977) apoyan esta sugerencia debido a que la infusión de gas H₂ restableció la producción de CH₄ en medios *in vitro* que fueron dosificados con monensina. Adicionalmente, la reducción de la disponibilidad de H₂ podría afectar la eficiencia de las reacciones de conservación de energía (Producción de ATP), lo que podría repercutir en la viabilidad de las metanogénicas en el rumen, como fue sugerido por Ellis *et al.* (2008) o Wünschiers *et al.* (2013).

Por otro lado, el cambio en el patrón de fermentación podría ser explicado porque la monensina selecciona a favor de bacterias productoras de propionato. Las bacterias propionogénicas, al usar H₂ para la síntesis de propionato compiten con las *archaeas* metanogénicas disminuyendo su sustrato. En concordancia con esto, la monensina tiene un efecto consistente en el incremento de la proporción de propionato en el líquido ruminal (Bergen y Bates 1984; Russell y Strobel 1989).

La suplementación con ionóforos ha reducido la metanogénesis hasta en un 25% pero la duración del efecto inhibitorio ha sido variable (Johnson y Johnson, 1995).

Hook *et al.* (2009) estudiaron, mediante biología molecular, los cambios en la población metanogénica en respuesta a la inclusión de monensina. No obstante que hubo disminución numérica de la población de metanogénicos por efecto de monensina, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa. La reducción de la producción de CH₄ reportada en la literatura sin cambio en el número de metanogénicas sugiere que la eficiencia de la producción de CH₄ fue menor por la baja disponibilidad de H₂.

Odongo *et al.* (2007) investigaron el suministro continuo de monensina por seis meses en vacas lecheras. Veinticuatro vacas recibieron una ración RTM con o sin monensina (24 mg/kg), fueron alimentadas por pareja y se midieron mensualmente los

niveles basales de metano en el rumen. Se encontró que el tratamiento con monensina causó una reducción entre 7 a 9% en la producción de CH₄ en comparación con el tratamiento control. El efecto de la monensina se mantuvo durante los seis meses del estudio.

Sin embargo, en otros estudios el efecto de la monensina ha sido inconsistente, debido quizá a diferencias en la composición de las dietas, diferentes métodos de medición del CH₄, dosis o adaptación microbiana (Appuhamy 2013).

Guan *et al.* (2006) investigaron el uso de monensina (33 mg /kg) y del nivel de concentrado en la dieta sobre la producción de CH₄ en novillos, utilizando la técnica de gas traza hexafluoruro de azufre (HF₆). En las primeras dos semanas, la monensina redujo la producción de CH₄ y el conteo de protozoarios, independientemente del nivel de concentrado. Sin embargo, los números de protozoarios y los niveles de producción de CH₄ retornaron a los niveles basales después de 6 y 3 semanas para las dietas bajas o altas en concentrado suplementadas con monensina respectivamente (es decir, en los animales alimentados con más concentrado en la dieta, la resistencia a monensina tardó menos en presentarse). Los autores concluyeron que el efecto de la monensina sobre el nivel de producción de CH₄ en el rumen está relacionado a la población de protozoarios ciliados y que cuando esta población se adaptó a la monensina, los niveles de producción de CH₄ regresaron a los niveles previos al tratamiento. Estos datos podrían limitar el uso de la monensina en el ganado lechero.

En un trabajo diseñado para estudiar el efecto de la suplementación discontinua de monensina sobre la producción de CH₄ en vacas lecheras lactantes (Sauer *et al.*, 1998), se ofreció una dieta con monensina (24 mg/Kg MS) en raciones totalmente mezcladas (RTM) por tres semanas, seguido por una dieta sin monensina por cinco meses para nuevamente, en última instancia ofrecer la dieta con monensina por un segundo período de 3 semanas. En las primeras tres semanas, la suplementación de monensina disminuyó el consumo de alimento, incrementó la producción de propionato en el rumen y, por otro lado, disminuyó la producción de CH₄. Sin embargo, en el segundo período de suplementación con monensina, ya no se detectaron los efectos que se observaron durante el primer periodo con monensina sobre la producción de CH₄ y el patrón de fermentación. Los autores sugieren que la flora pudo desarrollar resistencia a la monensina; pero este argumento puede no ser aceptable porque la resistencia se desarrolla cuando se suministra el

antibiótico de forma continua (Russell y Houlihan, 2003). Además, el período de retiro de la monensina fue demasiado largo para esperar que las bacterias adaptadas se mantuvieran en el rumen por largo período, por lo cual, otros factores pudieron haber contribuido a los resultados reportados por Sauer *et al.* (1998). Por otro lado, se han estudiado esquemas de rotación en el suministro de ionóforos para disminuir la aparición de resistencia microbiana, sin que se indique que la resistencia se mantenga a través del tiempo (Guan *et al.*, 2006).

Es importante determinar si el efecto de la monensina es afectado por el tipo de grano o su procesamiento y si los cambios en la producción de CH₄ están relacionados con cambios en las poblaciones metanogénicas o con cambios en los patrones de fermentación en el rumen.

Métodos basados en PCR para estimar las poblaciones metanogénicas

Debido a sus características y requerimientos fisiológicos particulares, las *archaeas* metanogénicas son microorganismos muy difíciles de aislar y mantener en cultivo (Zhou *et al.*, 2011). Por esta razón, muchos investigadores han escogido estudiar las poblaciones metanogénicas con técnicas no dependientes de cultivo.

La mayoría de estas técnicas son moleculares y su éxito recae en la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos de la extracción en la muestra. Con el desarrollo de estas técnicas se han podido identificar y caracterizar muchos microorganismos metanogénicos, con base en el análisis de la diversidad molecular de las secuencias del gen *16S rRNA* y, recientemente del gen *mcrA*. Este último gen tiene la ventaja de ser específico para los metanogénicos y codifica la síntesis de la enzima *Metil coenzima M reductasa*, la cual cataliza el paso final de la metanogénesis (Denman *et al.*, 2007).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más poderosa para la detección de pequeñas cantidades de ácidos desoxirribonucleicos o secuencias objetivo. Las secuencias son amplificadas en proporción a la cantidad inicial presente en la muestra lo que condujo al desarrollo de la *RT-PCR punto final cuantitativa*. Con la electroforesis y el bromuro de etidio, se verifica la expresión y el tamaño del gen objetivo en el producto de reacción de la RT-PCR. Sin embargo, debido a que en la PCR punto final

la amplificación es variable a través del curso de tiempo de la reacción se pierde sensibilidad y no puede ser usada para la cuantificación de secuencias objetivo (Fraga *et al.*, 2014).

En contraste, la PCR en tiempo real (qPCR) funciona de manera similar a la RT-PCR, con la diferencia de que la qPCR mide el número de copias de la secuencia objetivo producidas en cada ciclo de amplificación por medio de fluorescencia. La técnica cuantifica la producción de secuencias objetivo en la fase exponencial de la reacción de PCR, cuando la eficiencia de la reacción es cercana al 100%, a diferencia de RT-PCR donde la medición del producto se realiza en la fase final o “plateau” (Fraga *et al.*, 2014). Con la qPCR el número de copias de un gen particular se puede determinar de forma precisa (Zhou *et al.*, 2011).

El método de fluorescencia usado con mayor frecuencia es el SYBR Green. Este es un colorante no específico que se une a todas las hebras de ADN de doble cadena y emite fluorescencia cuando está unido a las cadenas de ADN. Tras cada ciclo, al aumentar la cantidad de secuencias objetivo hay un aumento de la cantidad de ADN de doble cadena, por lo que se emite y registra más fluorescencia por el detector del equipo (Higuera *et al.*, 2012). Sin embargo, este método de fluorescencia requiere que los iniciadores sean muy específicos para evitar la formación de otros productos diferentes a la secuencia objetivo, ya que el colorante no puede distinguir entre los diferentes productos de doble cadena lo que podría resultar en una sobreestimación del número de copias del gen objetivo.

Entre las ventajas que tiene qPCR sobre la RT-PCR convencional se ha mencionado que la reacción es más rápida, ya que requiere un menor número de ciclos y no es necesaria la detección y medición de productos posterior a la electroforesis. Además, el uso de colorantes fluorescentes permite la detección de cantidades muy pequeñas de secuencias objetivo.

Una desventaja es que se requiere hacer una fuerte inversión para adquirir el equipo necesario para la prueba y el costo relativamente alto de los reactivos.

Hay pocos estudios que hayan aplicado la qPCR para analizar cuantitativamente las poblaciones de *archaeas* metanogénicas en respuesta a los cambios en la dieta de los animales.

A pesar del hecho que los ingredientes y la composición de la dieta juegan un papel importante en la producción de CH₄ por los rumiantes, no se han hecho esfuerzos suficientes para evaluar la respuesta de las comunidades metanogénicas a diferentes estrategias nutricionales y relacionar dichos cambios con la mitigación de las emisiones de CH₄ (Chong *et al.*, 2014).

Monensina es ampliamente utilizada por su efecto en la fermentación ruminal y en distintas poblaciones microbianas, mientras que el procesamiento de los granos es usado para mejorar la eficiencia del uso del almidón y de la energía en el rumen. Sin embargo, se desconoce si sus efectos en la fermentación ruminal y en las poblaciones microbianas son independientes o existe algún tipo de interacción. Así mismo, existen pocos datos de la respuesta de las comunidades metanogénicas al uso de estas estrategias.

CAPÍTULO III OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte del proyecto institucional: “**Emisiones de metano, su relación con factores nutricionales y genéticos y desarrollo de estrategias de mitigación en tres sistemas de producción de leche de bovino en México**” que tiene como objetivo obtener indicadores de la producción de metano para desarrollar estrategias nutricionales y reducir o mitigar con ello las emisiones de metano en México.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el uso de estrategias nutricionales sobre los cambios de las poblaciones microbianas (*archaeas* metanogénicas y protozoarios) y su relación con el patrón de fermentación y la producción de metano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de diferentes estrategias nutricionales:
Procesamiento del grano de maíz (molido vs rolado en seco) y la inclusión de un ionóforo (monensina sódica) sobre los cambios del patrón de fermentación ruminal de novillos.
2. Determinar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, la producción *in vitro* de gas y de CH₄ y la cinética de producción de gas de las dietas experimentales en respuesta al procesamiento del grano de maíz y la inclusión de monensina sódica.
3. Estimar la producción de metano *in vivo* de novillos alimentados con dietas a base de ensilado de maíz y concentrado que incluyen monensina sódica y dos procesamientos del grano de maíz (molido vs rolado en seco).

CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizaron dos pruebas experimentales en las instalaciones del CENID F y MA del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicadas en km 1 de la carretera a Colón en Ajuchitlán, Colón, Querétaro.

Experimento 1.

En la primera prueba el objetivo fue determinar *in vivo* el efecto del tipo de procesamiento de grano de maíz (molido vs rolado en seco) y la inclusión de un ionóforo (monensina sódica) sobre los cambios de las poblaciones de *archaeas* metanogénicas, protozoarios, y en la fermentación ruminal (pH, amonio, ácidos grasos volátiles).

Se utilizaron cuatro novillos de diferentes encastes con un peso vivo promedio de 805 kg (± 65 kg), provistos con una cánula en el rumen, los cuales fueron alojados individualmente en corrales (9x8 m) con piso de tierra, comedero de cemento tipo canoa con banqueta de piedra, sombra y agua a libertad. Los animales fueron pesados sin ayuno previo de agua o alimento en el día 1 de cada periodo experimental a las 10:00 horas con la finalidad de ajustar la cantidad de alimento ofrecido.

En el cuadro 4.1, se indica el esquema para la toma de muestras en cada período experimental. Los animales fueron alimentados diariamente una vez al día por la mañana y se fijó el consumo a un nivel de 1.8% de su peso vivo (base seca) del cual 51.3% de la ración total fue forraje y 48.7 % concentrado. Los rechazos de alimento fueron medidos en los últimos 3 días de cada periodo experimental. La composición porcentual de las dietas se expresa en el cuadro 4.2 y la composición química calculada de las mismas en el cuadro 4.3.

Cuadro 4.1 Programa de actividades de los periodos experimentales

Actividad	PERÍODO EXPERIMENTAL																						
	Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Alimentación	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Pesaje de los animales	X																					X	
Toma de muestras																				X	X	X	
Rechazos de alimento																				X	X	X	
Contenido ruminal																							
0 h																						X	
4 h																							X
8 h																				X			
Producción <i>in vitro</i> de gas y metano																							X

Cuadro 4.2 Composición porcentual de las dietas experimentales

	Tratamientos experimentales			
	A	B	C	D
Grano de maíz	Molido		Rolado	
Monensina (mg / kg)	0	21	0	21
Ingredientes	Base seca (%)			
Ensilaje de maíz	38.0	38.0	38.0	38.0
Mezcla de pasto nativos	13.3	13.3	13.3	13.3
Grano de maíz	25	25	25	25
Pasta de soya	12.2	12.2	13	13
Gluten de maíz	4	4	3.2	3.2
DDGS	2.49	2.49	2.14	2.14
Minerales	0.83	0.83	1	1
Aceite vegetal	2.5	2.5	2.5	2.5
Carbonato de calcio	1	1	1.06	1.06
Bicarbonato de sodio	0.5	0.5	0.5	0.5
Urea	0.18	0.18	0.295	0.295

Cuadro 4.3 Composición química calculada de las dietas experimentales

Componente nutricional	A	B	C	D
Proteína cruda, %	16.04	16.04	16.04	16.04
Proteína no degradable en rumen, % PC	34.76	34.76	35.17	35.17
Proteína degradable en rumen % PC	65.24	65.24	64.83	64.83
Energía metabolizable, Mcal/kg	2.69	2.69	2.69	2.69
Energía neta de mantenimiento, Mcal/Kg	1.85	1.85	1.84	1.84
Energía neta de lactación, Mcal/kg	1.73	1.73	1.73	1.73
Energía neta de ganancia, Mcal/Kg	1.20	1.20	1.18	1.18
FDN %	34.17	34.17	33.94	33.94
Calcio, %	0.58	0.58	0.60	0.60
Fósforo, %	0.31	0.31	0.34	0.34
Relación Ca: P	1.85	1.85	1.80	1.80

Determinación del tamaño de partícula del maíz utilizado en las dietas

Se realizó análisis del tamaño de partícula de los dos tipos de maíz usados en las dietas experimentales de acuerdo a la metodología y cálculos descritos por Baker y Herrman (1995). Los resultados se muestran en el cuadro 4.4.

Cuadro 4.4 Análisis de tamaño de partícula del grano de maíz usado en el experimento

Tamaño de partícula del maíz μm , % del total	Maíz Molido	Maíz roloado
>2000	4.97	80.53
600-2000	57.31	13.21
420-600	5.11	0.66
300-420	22.24	2.90
150-300	10.33	2.60
90-150	0.02	0.1
<90	0.02	.01
Tamaño de partícula promedio, μm	739.93	3067.89
Desviación estándar geométrica	2.07	5.62
Área de superficie, cm^2/g	185.66	152.03
Partículas/ gramo	47565.36	39992700

Procedimientos generales de muestreo

En los tres últimos días de cada periodo experimental (19,20 Y 21) se recolectó aproximadamente un kg de contenido ruminal de cada animal a las 0, 4 y 8 horas postprandiales. Se sortearon los tiempos de muestreo, de tal manera, que en el día 19 se colectó el contenido de las 8 horas postprandiales; en el día 20 el contenido de las 0 horas postprandiales (previo a la alimentación); y en el día 21 el contenido de las 4 horas postprandiales (Cuadro 4.1). El líquido ruminal se colocó en un termo a 39°C para su transporte al laboratorio. Una vez ahí, el contenido se licuó por dos minutos bajo atmosfera de CO₂ para separar las bacterias de las partículas sólidas. En seguida, se filtró el contenido ruminal a través de cuatro capas de gasa y se tomaron cinco submuestras.

Determinación del pH

Se tomó una alícuota de 50 ml de líquido ruminal filtrado, a la cual le fue medido su pH inmediatamente usando un pH metro portátil (Modelo Orion).

Determinación de nitrógeno amoniacal NH₃-N

A la segunda alícuota de 100 ml se le midió inmediatamente la concentración de amonio con el uso de un electrodo ion selector (AOAC, 1999). Para este procedimiento se prepararon las siguientes soluciones:

- 1) Solución stock (1000 ppm): Se pesó 0.315 g de cloruro de amonio (NH₄ Cl) en un frasco de 100 ml y este se aforó con agua destilada. A partir de esta solución se hicieron diluciones para tener concentraciones finales de 100,50,20,10,5 y 1 ppm en las soluciones de calibración.
- 2) Solución ajustadora (ISA =Ionic Strength Adjustor): Se pesaron 3.72 g de EDTA disódico en un frasco de 200 ml y se agregaron 20 ml de metanol. Por otro lado, se pesaron 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) en un vaso de precipitado de 500 ml y se disolvieron con 100 ml de agua destilada. El NaOH disuelto se transfirió al frasco de 200 ml que contenía la mezcla de EDTA y metanol y se llevó a un volumen de 200 ml con agua destilada.
- 3) Solución de llenado del electrodo: Se disolvieron 5.349 g de cloruro de amonio (NH₄ Cl) en 1 litro de agua destilada.
- 4) Preparación del electrodo: En la punta de la camisa del electrodo se colocó una membrana impermeable o selectiva al ion amonio (NH₄), evitando manipularla

demasiado. Utilizando una pipeta, se añadió dentro de la camisa del electrodo 2.5 ml de la solución de llenado. Por último, el electrodo se insertó dentro de su camisa y se dejó reposar toda la noche en un vaso con solución stock 1000 ppm.

- 5) Para obtener la curva de cuantificación, se realizó la determinación de los mv de las soluciones de calibración descritas previamente las cuales tienen una concentración conocida en ppm de amonio. A los 100 ml de cada solución de calibración se les añadió 2 ml de solución ISA e inmediatamente se tomó la lectura en mv con el potenciómetro (modelo Orion). El número de mv obtenidos en cada solución de calibración se regresó contra el logaritmo de la concentración de amonio en ppm de los estándares ($\log \text{NH}_3$ s) para obtener la siguiente ecuación:

$$mv = -58.498 \log \text{NH}_3 + 161.15$$

Donde la variable dependiente y es la lectura en mv obtenida en el potenciómetro y la variable independiente x es el logaritmo de las partes por millón de nitrógeno amoniacal (ppm). La ecuación de predicción tiene $R^2=0.9996$ y error estándar de predicción (EER) de 0.93971. Para determinar las ppm de nitrógeno amoniacal se despejó de la ecuación la variable independiente ($\log \text{NH}_3$):

$$\log \text{NH}_3 = \frac{mv - 161.15}{-58.498}$$

Una vez obtenido el logaritmo, este se usó como exponente para elevar el número 10 y así obtener el nitrógeno amoniacal en ppm de la muestra:

$$\text{NH}_3 (\text{ppm}) = 10^{\log \text{NH}_3}$$

El resultado NH_3 (ppm) se multiplicó por 0.1 para transformarlo en miligramos de amonio ($\text{NH}_3/100 \text{ ml}$). Para obtener la concentración de nitrógeno amoniacal (N- NH_3) se multiplicó los mg de amonio por la proporción del peso molecular del N en la molécula de amonio (0.823529).

- 6) Para la determinación de los mv en la muestra de líquido ruminal se repitió el mismo procedimiento que para las soluciones de calibración. A 100 ml de líquido ruminal se le añadieron 2 ml de solución ISA e inmediatamente se tomó la lectura con el potenciómetro. Posteriormente se usó la ecuación de predicción para determinar la concentración en ppm de la muestra.

Determinación del patrón de ácidos grasos volátiles (AGV)

Para determinar la concentración de los ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal, se siguió la metodología sugerida por Tejada (1992). Para lo cual, se colectó una alícuota de 5 ml de líquido ruminal filtrado que se almacenó en congelación a -20°C hasta su análisis. Posteriormente, las alícuotas fueron descongeladas y se les agregó 1 ml de ácido metafosfórico (25% p/v), dejándose reposar en hielo por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las alícuotas fueron centrifugadas a 12000 rpm. Debido a que el líquido ruminal aún presentaba agregados de proteína se procedió a centrifugar una segunda ocasión bajo las mismas condiciones. Entonces las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases en un equipo 6890 GC (Agilent technologies) equipado con detector de ionización de flama (FID), un automuestreador (7683B series Injector autosampler), una columna capilar DB-WAX (modelo 122-7032 ;30 m de longitud, 0.250 mm diámetro interno y con una película con grosor de 0.25). Se utilizó helio como gas acarreador y la separación de los ácidos grasos volátiles se logró con las siguientes condiciones de las corridas: La temperatura de la columna se estableció en 180°C por 45 minutos y se utilizó una rampa de temperatura, que consistió en incrementos de 30° por 5 minutos hasta alcanzar una temperatura final de 185° y, posteriormente se redujo 30° cada 3 minutos. Para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles en g/L se elaboró una curva estándar usando estándares de cada ácido graso donde el componente lineal se estimó en rangos de 0 a 16 g/L para acetato y butirato, 0 a 2 g/L para propionato, 0 a 0.4 g/L para valerato e isovalerato y 0 a 0.2 g/L para isobutirato. Se inyectó un μl de cada estándar para determinar su área generada por el cromatógrafo (Área). Las áreas se regresaron sobre las concentraciones de los estándares (Sigma Aldrich química S de RL) para generar una ecuación de predicción. Posteriormente, se despejó la concentración (g/L) de la ecuación para que con base en el área de las muestras problemas, se estimara su concentración de AGV. En el cuadro 4.5 se muestran las ecuaciones de predicción para cada ácido analizado.

Cuadro 4.5 Ecuaciones de calibración para determinar la concentración de los AGV.		
Ecuación	R ²	EER
$\text{Área} = 1.48E08(\text{g/L Acetato}) + 4.43E07$	99.48	5.41×10^7
$\text{Área} = 12.11E08(\text{g/L propionato}) - 5.53E06$	99.53	1.46×10^7
$\text{Área} = 2.81E08(\text{g/L butirato}) + 2.96E07$	99.39	1.35×10^8
$\text{Área} = 4.95E08(\text{g/L Isobutirato}) - 7.54E06$	99.12	2.44×10^6
$\text{Área} = 4.19E08(\text{g/L Isovalerato}) + 2.46E06$	98.15	5.09×10^6
$\text{Área} = 4.28E08(\text{g/L Valerato}) - 1.31E06$	99.54	3.57×10^6

Por ejemplo, para acetato:

$$\text{g/L acetato} = \frac{\text{Área} - 4.43E07}{1.48E08}$$

Para determinar la cantidad de moles en la muestra de cada ácido, la concentración estimada (g/L) fue dividida entre su peso molar.

$$\text{Ácido graso volátil (mol)} = \frac{\text{Concentración g/L}}{\text{Peso molecular del ácido}}$$

Donde:

Pesos moleculares: Acetato (60.05), Propionato (74.06), Butirato e isobutirato (88.11), Valerato e Isovalerato (102.13).

La concentración de los ácidos se expresó en milimoles (mM) al multiplicar el número de moles por 1000.

$$\text{mmol xAGV} = \text{Mol xAGV} * 1000$$

Para obtener la cantidad total de AGV (mmoles) de la muestra, se sumó la cantidad de cada ácido graso volátil (mmol):

$$\text{AGVT (mmol)} = \text{Acetato} + \text{Propionato} + \text{Butirato} + \text{Isobutirato} + \text{Valerato} + \text{Isovalerato}$$

El porcentaje molar de cada ácido (% molar) fue calculado dividiendo el número de milimoles (mmol xAGV) entre la cantidad total de AGV (mmol) y multiplicándolo por 100:

$$\%molar \ xAGV = \frac{mmol \ xAGV}{AGVT \ (mmol)} * 100$$

Por último, la relación acetato: propionato (Ac:Pr) de cada muestra se calculó dividiendo el porcentaje molar de acetato (% molar Ac) entre el porcentaje molar de propionato (% molar Pr):

$$Relación \ Ac:Pr = \frac{\% \ molar \ Ac}{\% \ molar \ Pr}$$

Cuantificación de las poblaciones de protozoarios ruminales

Para el conteo de las poblaciones de protozoarios se siguió la técnica recomendada por Dehority (1984). Se tomó una alícuota de 50 ml de líquido ruminal y se colocó en un vaso de precipitado (120 ml), se añadió un volumen igual de formalina al 50% (concentración de formaldehído al 18.5%) resultando en una dilución 1:2. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración hasta que se realizó el conteo. Para llevar acabo el conteo se pipeteó una alícuota de 1 ml de muestra formalinizada con una pipeta de orificio amplio (3mm) en un tubo de 10 ml. Se añadieron 2 gotas de una solución de colorante verde brillante (2 g de colorante verde brillante en forma de polvo y 2 ml de ácido acético glacial aforados a 100 ml con agua destilada), y se permitió que el colorante actuara toda la noche. Después de teñir, se añadieron 9 ml de solución de glicerina al 30% (v/v) resultando en una dilución de 1:20 del contenido ruminal original. La muestra diluida fue pipeteada en una cámara de conteo *Newbauer improved* con una pipeta de orificio amplio, la cual es la única modificación hecha con respecto a la técnica original (Dehority, 1984). Los protozoarios fueron contados en los cuadros de las esquinas de la cámara con magnificación de 40x. Cada muestra fue contada por duplicado, y si el coeficiente de variación excedía el 30% se contaba por triplicado.

La concentración fue estimada con la siguiente fórmula (Nuñez y Bouda 2007):

$$\text{Número de células} * 10^9 / \text{litro} = \frac{\text{Número de células contadas} * \text{dilución} * \text{distancia entre plataforma y cubreobjetos}}{\text{Número de cuadros de } 1\text{mm}^3 * 1000}$$

Extracción de ADN y cuantificación del número de *archaeas* metanogénicas por la técnica de PCR en tiempo real.

Para la extracción de ADN, se tomó una alícuota de 5 ml de líquido ruminal filtrado en un tubo Falcon de plástico con capacidad de 15 ml. Las muestras fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio A-03 de rumiología y metabolismo nutricional de la unidad académica del instituto de neurobiología, Campus Juriquilla de la UNAM. Previa a la extracción, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 4500 rpm para retirar el sobrenadante. Una vez hecho lo anterior, el ADN fue extraído del pellet sobrante usando el método RBB+C descrito por Yu y Morrison (2004), haciendo una modificación para el primer paso de lisis celular, la cual consistió en usar tubos de lisis (ZR Bash Beating de Zymo Research). Se verificó la integridad de ADN corriendo 1µl en electroforesis con gel de agarosa al 1%. El ADN microbiano total de rumen fue diluido 1:10 antes de su uso en el PCR en tiempo real cuantitativo.

El número de copias del gen *mcrA* asociados con los metanógenos ruminales fue medido usando PCR en tiempo real (qPCR). Las parejas de iniciadores utilizados fueron escogidos de la literatura y se muestran a continuación:

F-TTCGGTGGATCDCARAGRGC	(Fuente:(Denman <i>et al.</i> , 2007))
R-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	(Tamaño:160pb)

Los iniciadores fueron diseñados para la detección del gen *mcrA* que codifica a la *Metil coenzima-M reductasa*, enzima que es específica de las *archaeas* metanogénicas y cataliza la reacción final de la metanogénesis donde el grupo *Metil-CoM* es reducido formando CH₄ y heterodisulfuro de CoM-CoB (CoM-S-S-CoB) (Denman *et al.*, 2007).

La amplificación en PCR en tiempo real fue realizada por duplicado usando un termociclador Step One (Applied Biosystems). La mezcla de reacción fue preparada utilizando el LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) en un volumen final de 10 µl: 3 µl de Master mix (Concentración final de 3 mM de MgCl₂, concentración final de primer de 300 nM) y una concentración final de ADN de 100 ng. Las condiciones de ciclo

fueron las siguientes: 50°C por dos minutos y 95°C por dos minutos para desnaturalización inicial, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por un minuto para el alineamiento de los iniciadores y la elongación de productos. La especificidad del producto se determinó a través del análisis de la curva de disociación de los productos terminales de PCR incrementando la temperatura a una tasa de 1°C/30 segundos desde 60 hasta 95°C.

Para construir una curva de cuantificación absoluta para el ensayo de PCR en tiempo real, se preparó un estándar derivado del ADN de todas las muestras de tratamientos. Se homogeneizó una muestra compuesta de ADN tomando la misma cantidad de ADN (50ng) de todos los extractos de ADN (Lengowski *et al.*, 2016), y para la generación del estándar se realizó una PCR convencional en un termociclador BIORAD (modelo T100) con las siguientes condiciones: Concentración final de 100 ng de plantilla de ADN, 300 nM de concentración de primer, 1 µM MgCl₂, 5µl de buffer 10x PCR, 1 µl de dNTPs, 1µl de enzima Taq polimerasa, 38 µl de agua grado PCR en un volumen total de 50 µl. Las condiciones de ciclado fueron 50°C dos minutos, 95°C 2 minutos, 40 ciclos de 95°C 15 segundos, 60°C por un minuto y 72°C 30 segundos. Una vez que se obtuvo el producto de la reacción, este fue purificado usando el kit de purificación *Wizard® SV Gel and PCR Clean up System* de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la única modificación de la elución del ADN en 30 µl de agua *miliQ* a una temperatura de 65°C; el ADN purificado fue cuantificado por medio de espectrofotometría. La concentración del número de copias en el estándar se calculó con base en la longitud del producto de PCR y la concentración de masa por medio de la siguiente fórmula (Lee *et al.*, 2008; Dhanasekaran *et al.*, 2010):

$$\text{Número de copias}/\mu\text{l} = \frac{6.022 \cdot 10^{23} (\text{moléculas por mol}) \cdot \text{Concentración de ADN (g}/\mu\text{l})}{\text{Número de pares de bases} \cdot 660 \text{ Da}}$$

Donde $6.022 \cdot 10^{23}$ (moléculas por mol) es el número de Avogadro

660 Da es el peso promedio de un par de bases en daltones.

Se hicieron 6 diluciones seriales de 1:10 para obtener los puntos de la curva antes del ensayo. Se realizó una regresión lineal simple del logaritmo del número de copias del estándar contra el ciclo umbral [C(T)] de cada dilución de ADN y se obtuvo la ecuación:

$$y = -0.29x + 11.666$$

donde y es el logaritmo del número de copias del gen *mcrA* y x es el Ct, con un coeficiente de R^2 de 0.988 y error estándar de regresión de 0.23. Esta ecuación fue usada para la cuantificación del número de copias del gen *mcrA* de las muestras de líquido ruminal sustituyendo en ella el valor de Ct de la muestra.

Experimento 2

El objetivo fue determinar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), la cinética de producción de gas (CPG) y las producciones *in vitro* de gas y de metano durante 48 h de muestras de las dietas experimentales.

Producción *in vitro* de gas y metano por la técnica de Menke y Staingass

Las determinaciones se realizaron en el día 21 de cada periodo experimental. Las muestras de las dietas experimentales se secaron por 48 h en una estufa de aire forzado a 55 °C y fueron molidas con un molino tipo Wiley (Arthur H Tomas Corp., Filadelfia, PA), utilizando una criba de 2 mm.

Preparación soluciones y tamaño de muestras

Se pesó 0.5 g de muestra y se colocó dentro de frascos de borosilicato con capacidad de 125 ml. En el día 20 se prepararon las soluciones amortiguadora y reductora de acuerdo con las especificaciones descritas por Van Soest *et al.* (1991). Se ajustó el pH de la solución amortiguadora a 6.8, agregando la cantidad necesaria de HCl (36.5-38 %). En cada frasco, se agregó 40 ml de la solución ajustada y 2 ml de la solución reductora. Los frascos fueron cubiertos y se dejaron en el baño maría a 39°C mientras se procedía con la colecta de contenido ruminal.

Preparación del líquido del rumen

Se obtuvo líquido del rumen de cada novillo cuatro horas después de la alimentación de la mañana. Las muestras de líquido ruminal fueron procesadas individualmente como se describió anteriormente. Se agregaron 10 ml de líquido ruminal procesado a los frascos con muestras de acuerdo con el diseño experimental. Inmediatamente se saturó el espacio de gas ("*headspace*") del frasco con CO₂ y, entonces, fue sellado herméticamente con un tapón de hule y anillo de aluminio. Se colocaron en un baño maría a 39°C con agitación para proceder con la fermentación.

Medición y almacenamiento del gas generado

Al final de la incubación (48 h), se detuvo la fermentación al colocar los frascos en agua fría. Se midió la producción total de gas (PG) mediante el método de desplazamiento de un líquido con una probeta invertida el cual es una adaptación del método de Menke y Steingass (1988), que permite colectar la muestra de gas a presión atmosférica. La muestra

se almacenó en un tubo de ensayo invertido con solución salina saturada al 95% (37 g Na Cl/100ml de agua destilada) y acidificada con HCl (36.5-38%) hasta un pH de 0.5. Las muestras de gas fueron almacenadas de esta forma a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis.

Se realizaron cuatro corridas (bloques) y en cada una se incubaron tres réplicas por tratamiento con la inclusión de dos blancos por cada tratamiento experimental.

Fórmulas para la determinación de la producción total de gas.

$$\text{Gas total (ml/g MS)} = \frac{VT - VB}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

donde *Gas total (ml/g MS)* es el volumen total de gas producido por gramo de muestra seca de dieta en mililitros, *VT*: es *volumen total de gas (48 h)* en mililitros y *VB*: *Volumen promedio de gas producido en los frascos blanco* en mililitros.

Determinación de la concentración de metano en las muestras de gas.

Se analizó metano por cromatografía de gases en un equipo 6890 GC (Agilent technologies) con detector de ionización de flama FID, una columna HP-PLOT/Q de 30 m de longitud. La detección se realizó bajo una isoterma a 170 °C. El volumen de inyección manual fue 250 µl en modo Split usando helio como gas acarreador. Para realizar la curva de calibración, se inyectaron diferentes cantidades (10, 20, 40, 60, 80 y 100 µl) de un estándar de gas metano (pureza 99%, *Praxair México, Sa de CV*). El área producida por la muestra de gas se regresó sobre las cantidades de gas metano inyectadas.

La ecuación generada es

$$\text{Área} = 8.17E06(\text{CH}_4\mu\text{l}) - 7.80E07$$

La cuál tiene un coeficiente de determinación (R^2): 0.993 y un error estándar de regresión de 2.63E7, donde la variable dependiente *Área* es el área del pico de metano de la muestra generada por el cromatógrafo y la variable independiente x son los microlitros de metano en la muestra. Para obtener los microlitros de metano en la muestra, se despejó µl de (CH_4):

$$CH_4 \text{ en la muestra}(\mu\text{l}) = \frac{(\text{Área} + 7.81E07)}{8.17E06}$$

El Área se refiere al área generada al inyectar 250 μl de muestra. Una vez que se determinaron los microlitros de metano en las muestras, se realizaron los siguientes cálculos:

Porcentaje de metano en la muestra de gas (%)

$$\% \text{ metano en el gas} = \frac{CH_4 \text{ en la muestra} (\mu\text{l})}{250 \mu\text{l}} \times 100$$

Producción de metano ($\mu\text{l} / \text{ml}$)

$$CH_4(\mu\text{l}/\text{ml}) = \frac{\mu\text{l} (CH_4)}{0.250}$$

Producción total de metano en la muestra (microlitros totales)

$$CH_4 \text{ total en la muestra} (\mu\text{l}) = CH_4 (\mu\text{l}/\text{ml}) * \text{Volumen total gas} (\text{ml})$$

Donde volumen total gas es el volumen total de gas producido durante la incubación (48 horas).

Producción total de metano en la muestra (mililitros totales)

$$CH_4 \text{ total en la muestra} (\text{ml}) = \frac{CH_4 \text{ total en la muestra} (\mu\text{l})}{1000}$$

Producción total de metano en la muestra (mililitros por gramo de materia seca)

$$CH_4 (\text{ml}/\text{g MS}) = \frac{CH_4 \text{ total en la muestra} (\text{ml})}{\text{Peso de la muestra}(\text{g}) * \text{MS muestra} (\%)}$$

Producción total de metano en la muestra (mililitros por gramo de materia orgánica)

$$CH_4 (\text{ml}/\text{g MO}) = \frac{CH_4 \text{ total en la muestra} (\text{ml})}{\text{Peso de la muestra} (\text{g}) * \text{MS muestra} (\%) * \text{MO organica muestra} (\%)}$$

Cinética de la producción de gas (Sistema automatizado de Ankom)

El objetivo específico de este ensayo fue determinar el efecto de la inclusión de monensina sódica y de grano rolado en los parámetros de la cinética de la producción de gas (PGT). Se usó el sistema automatizado de monitoreo de gas ANKOM^{RF} (Ankom Technology Corp, Macedon, NY), el cual cuenta con sensores de presión inalámbricos y registra la presión de gas acumulada en tiempo real.

Bajo el mismo diseño de cuadrado latino y en el último día de cada período experimental, muestras de cada dieta fueron incubadas durante 48 horas por triplicado junto con dos frascos blanco (sin muestras).

Como en la prueba anterior, las muestras de las dietas experimentales fueron secadas por 48 horas a 55°C en una estufa de aire forzado. Posteriormente, las muestras fueron molidas con un molino de laboratorio tipo Wiley (Arthur H Tomas Corp., Filadelfia, PA), a través de una criba de 2 milímetros. De las muestras procesadas, se pesaron 0.5 ± 0.01 g de muestra y se colocaron en frascos con 310 ml de capacidad.

Se utilizaron las soluciones amortiguadora y reductora recomendadas por Van Soest *et al.* (1991), que se describen en el manual del sistema automatizado para monitorear la producción de gas (Ankom Technology Corp., Macedon, NY).

El líquido ruminal que se utilizó como inóculo se obtuvo de cada uno de los novillos y se procesaron por separado. Así, cada inóculo se mezcló con la solución amortiguadora en una proporción de 1 a 5 (v/v) y de esta mezcla se agregaron 100 ml en cada frasco con muestra. El espacio sobre la mezcla se saturó con gas CO₂, se cerró inmediatamente y se colocó en el baño maría con agitación constante y a una temperatura de 39 °C grados.

Parámetros del sistema de monitoreo para medir la producción de gas

Los módulos envían una señal a la computadora con la presión (libras por pulgada cuadrada o psi, por sus siglas en inglés) dentro del frasco o reactor cada 15 minutos. La presión actual y la acumulada se registra en una hoja de Excel ©. Para evitar que la presión se eleve demasiado en el frasco, se configuró el sistema para que las válvulas de los módulos se abran cuando la presión alcanza 1.5 psi. De esta manera, se obtienen 192 observaciones de presión para el análisis de la cinética de presión.

Para determinar la producción de gas en mililitros, se siguieron las fórmulas y cálculos propuestos por el fabricante Ankom (ANKOM Technology Corp. Macedon NY). Así, la presión de gas fue convertida a moles de gas utilizando la ley de los gases ideales (Clapeyron, 1834).

Ley de gases ideales

$$n = p(V/RT)$$

donde: n= gas producido en moles (mol)

p= presión en kilopascales

V= Volumen del espacio de cabecera del frasco

T= temperatura en grados kelvin

R= Constante de gases (8.314472 L*kPa*K⁻¹ mol⁻¹)

Se calculó la producción de gas (ml) se usando la ley de Avogadro. En condiciones estándar, un mol de cualquier gas a 273.15 °K y ejerciendo una presión de una atmósfera en las paredes del recipiente que lo contiene, ocupará 22.4 L. Una psi equivale a 6.894757295 kPa) y una atmosfera de presión equivale a 101.325 kpa.

Así, la presión acumulada de gas (psi) fue convertida de moles de gas a ml con la siguiente formula:

$$\text{Gas producido (ml)} = n * 22.4 * 1000$$

Para determinar la producción de gas (ml/48h) se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Presión acumulada (psi)} = \text{Presión muestra (psi)} - \text{presión blancos (psi)}$$

Donde Presión acumulada (psi) es la presión en la muestra al tiempo t ajustada por la cantidad de gas producida por los blancos.

$$\text{Gas (ml)} = \frac{\text{Presión acumulada (psi)} * 6.894757293 \text{ (kpa/psi)} * \text{volumen cabecera (litros)}}{101.325 \text{ kpa}}$$

Donde 1 psi equivale a 6.894757293 kilopascales (kpa). Volumen cabecera es el volumen del frasco no ocupado por líquido (0.210 L). 101.325 kpa= 1atmosfera.

Producción de gas (g de muestra seca x 48 h)

$$\text{Gas (ml/g MS digestible)} = \frac{\text{Gas (ml)}}{(\text{Peso muestra} * \% \text{MS muestra} * \text{DIVMS muestra})}$$

Dónde: Gas (ml/g MS digestible) es la cantidad de gas por gramo de materia seca digestible al tiempo t. DIVMS muestra es la digestibilidad in vitro de la MS de las muestras de las dietas experimentales. % MS es el porcentaje de materia seca de cada muestra. Peso de la muestra es el peso de muestra incubado (0.5±.1 g).

Los datos de producción de gas (ml/g MS digestible) se ajustaron a un modelo exponencial monomolecular (Fekedulegn *et al.*, 1999):

$$PGT = a(1 - e^{-kt})$$

donde PGT= Producción de gas total

a= Producción de gas máxima (a=0 cuando t=0)

e= exponente (Producción potencial de gas cuando t tiende a infinito).

k= tasa de producción de gas (ml h⁻¹)

t=tiempo.

Dicho modelo fue escogido por ser el que mejor se ajustó a los datos (R²) y mostrar menor suma de cuadrados del residual. Para estimar los parámetros a, y k se utilizó el procedimiento de regresión no lineal (PROC NLIN) del paquete estadístico SAS (SAS v 9.3 TS, Level 1M2).

En el apéndice 1 se muestra el código para el programa SAS que se utilizó para determinar los parámetros del modelo no lineal. Para calcular la tasa de producción de gas, se obtuvo la derivada de la producción de gas respecto a tiempo (dV/dt).

Digestibilidad *in vitro* de las dietas experimentales

En el día 21 de cada período experimental, la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se determinó con el uso de bolsas filtrantes Ankom F57 (Ankom Technology Corp., Macedon, NY), siguiendo el procedimiento propuesto por el fabricante.

En cada bolsa F57, se pesó y colocó 0.5 g de muestra por cuadruplicado y dos blancos por tratamiento. Previo a la colecta del líquido de rumen, se agregaron 384 ml de solución amortiguadora Van Soest (Van Soest et al. 1991; Ankom Technology Corp., Macedon, NY) en cada frasco del equipo Daisy (Ankom Technology Corp., Macedon, NY) y se estableció una temperatura de 39 °C. El líquido se procesó como se ha indicado en la prueba de producción de gas y el inóculo para cada tratamiento se manejó de forma independiente.

Al final del tiempo de incubación (48 h), las bolsas con residuo fueron sometidas a una extracción con solución neutro detergente para eliminar las bacterias adheridas al residuo y evitar que la digestibilidad fuera subestimada (Van Soest et al., 1991). Al final de la extracción, las bolsas se lavaron con acetona (99 %), se secaron a 100°C toda la noche y se registró el peso seco (Residuo FDN) una vez que se enfriaron y se estabilizó el peso de las bolsas en un desecador. Posteriormente, las bolsas con el residuo FDN fueron incineradas a 600°C por 4 h en crisoles de vidrio tarados. Para obtener la MO del residuo se substrajo el peso de las cenizas.

Para determinar la digestibilidad de la MS y MO se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Residuo} = \text{Peso FDN} - \left(\text{Peso bolsa} * \frac{\text{Peso FDN blanco}}{\text{Peso bolsa blanco}} \right)$$

$$\text{Indigestibilidad MS} = \frac{\text{Residuo}}{\text{Peso muestra} * \left(\frac{\%MS}{100} \right)}$$

$$\text{Digestibilidad MS} = 100 * (1 - \text{Indigestibilidad})$$

$$\text{Residuo MO} = \text{Residuo} - (\text{Peso Vaso con cenizas} - \text{Peso vaso}) \\ - (\text{Peso vaso con cenizas Bl} - \text{Peso vaso blanco})$$

$$\text{MO inicial} = \text{Peso muestra} * \left(\frac{\%MS}{100} \right) * \left(\frac{\%MO}{100} \right)$$

$$\text{Indigestibilidad MO} = \frac{\text{Residuo MO}}{\text{MO inicial}}$$

$$\text{Digestibilidad MO} = 100 * (1 - \text{Indigestibilidad MO})$$

Dónde: Residuo es el material remanente de la incubación. Peso bolsa es el peso de la bolsa F57 de la muestra o del blanco (Peso bolsa blanco). Peso FDN es el peso de la bolsa con residuo o sin residuo (Peso FDN blanco) después de la extracción con solución neutro detergente. %MS es el porcentaje de materia seca de la muestra. Indigestibilidad MS es la indigestibilidad de la MS de la muestra en porcentaje. Digestibilidad MS es la digestibilidad de la materia seca en porcentaje. Residuo MO es el porcentaje de materia orgánica remanente en la muestra después de la incubación. MO inicial es el porcentaje de MO al inicio de la incubación. Indigestibilidad MO es la indigestibilidad de la MO en porcentaje. Digestibilidad MO es la digestibilidad de la MO en porcentaje.

Simulación del efecto de la monensina sódica y del procesamiento del grano de maíz en la producción *in vivo* de metano por novillos.

Se realizó una simulación del efecto que hubieran tenido la monensina sódica y el tipo de procesamiento del grano de maíz en la producción de CH₄ por los novillos; en específico, el objetivo fue determinar la cantidad de energía bruta perdida en forma de metano, así como su proporción como parte de la energía bruta total consumida para todos los tratamientos. Para tal propósito se usaron los datos de consumo de materia seca (CMS), los factores de emisión obtenidos de la producción *in vitro* de gas y CH₄, así como estimaciones del consumo de energía bruta de las dietas y datos como la densidad del CH₄ y su calor de combustión obtenidos de la literatura. La primera estimación que se realizó fue la del consumo de energía bruta, para lo cual se asumió que un kilogramo de alimento contiene 18.4 MJ (4.4 Mcal/kg) (Mc Donald *et al.*, 1995); se multiplicó entonces el CMS por 4.4 Mcal/Kg para estimar el consumo de energía bruta. La producción de CH₄ en litros se calculó como CMS*factor emisión (CH₄ ml/g MS), siendo los factores de emisión los valores de producción de CH₄ en la prueba *in vitro* determinados para cada dieta. La siguiente estimación fue la de la cantidad de energía bruta que representa el CH₄ producido, usando el valor del calor de combustión del gas CH₄ (11.95 Mcal/kg ó 1.65 Mcal/ L de metano). El paso final fue dividir la energía bruta del CH₄ entre el consumo de energía bruta estimado. Por otro lado, se usó el modelo propuesto por Wolin (1960) para estimar los moles de CH₄ usando las proporciones molares de AGV de la prueba *in vivo*.

Análisis estadístico

El experimento tuvo una duración total de 84 días. Los tratamientos consistieron en dietas integrales con grano de maíz (molido o rolado) y la inclusión de monensina sódica (0 ó 21 mg/Kg de MS dieta) en un arreglo factorial 2x2 y bajo un diseño de cuadrado latino 4x4 (Steel y Torrie, 1996). El modelo correspondiente es:

$$Y_{ijkl} = \mu + M_i + P_j + (MP)_{ij} + H_k + C_l + e_{ijkl}$$

Dónde:

Y_{ijkl} = Variable respuesta

μ =Media general

M_i =Efecto del i-ésimo nivel de monensina, i=1 a 2

P_j =Efecto del j-ésimo nivel de procesamiento del grano de maíz, j=1 a 2

MP_{ij} =Efecto de la interacción del i-ésimo nivel de monensina con el j-ésimo nivel de procesamiento del grano de maíz.

H_k =Efecto del k-ésimo periodo experimental k=1 a 4

C_l =Efecto del l-ésimo animal, l=1 a 4

e_{ijkl} =Error experimental

Se realizaron las pruebas de Shapiro Wilk, Kolmogorov-smirnov y Anderson-Darling con el procedimiento proc univariate del paquete estadístico SAS para probar la hipótesis nula de que las variables respuesta seguían una distribución normal. Para las variables de AGV a las 4 horas se eliminó una observación aberrante que estaba más allá de dos desviaciones estándar del promedio, por lo que para dichas variables se reportó el cuadrado medio del error como medida de la variación.

Para la variable DIVMS los resultados fueron analizados con un diseño de bloques completamente al azar usando el periodo experimental como criterio de bloqueo.

El modelo experimental es:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + P_j + (MP)_{ij} + H_k + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = La digestibilidad del i-ésimo nivel de monensina con el j-ésimo nivel de procesamiento en el k-ésimo periodo experimental.

μ = Media general

M_i = Efecto del i-ésimo nivel de monensina $i=1$ a 2

P_j = Efecto del j-ésimo nivel de procesamiento $j= 1$ a 2

MP_{ij} = Efecto de la interacción del i-ésimo nivel de monensina con el j-ésimo nivel de procesamiento

H_k = Efecto del k-ésimo periodo experimental $k= 1$ a 3

e_{ijk} = Error experimental

Se usaron los procedimientos generales para modelos lineales del paquete estadístico SAS. Cuando el efecto del tratamiento fue significativo, se realizaron contrastes ortogonales para determinar los efectos principales o su interacción. Los efectos del modelo se declararon significativos cuando $p < 0.05$, y como una tendencia cuando $p < 0.1$.

Se obtuvo el coeficiente de correlación entre el pH del líquido ruminal y la concentración de protozoarios utilizando el PROC CORR del paquete estadístico SAS 9.3 (SAS v 9.3 TS, Level 1M2).

CAPÍTULO V RESULTADOS

Experimento 1 patron de fermentación ruminal y poblaciones microbianas

En el cuadro 5.1 se muestran los resultados de las variables pH, concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), protozoarios (células ml⁻¹ x 10⁵) y *archaeas* metanogénicas (logaritmo del número de copias ml⁻¹); mientras que en el cuadro 5.2 se muestran los resultados de la concentración de ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal. Ambos muestran los resultados para las variables mencionadas dentro de cada tiempo de muestreo (0,4 u 8 horas).

pH

No se detectó interacción de los factores de estudio (Monensina*Procesamiento) para ninguna de las horas de muestreo (0 (p=0.27), 4 (p=0.7) u 8 horas(p=0.22)). A las 0 horas, hubo tendencia para la disminución del pH (p=0.06) por efecto de la monensina, pero no se detectó efecto del factor procesamiento (P=0.23). Para el pH a las 4 horas no se detectó efecto del método de procesamiento (P=0.17), ni de monensina (p=0.78). Se detectó que el pH disminuyó a las 8 horas por efecto de la monensina (P<0.05), pero no se encontró efecto del factor procesamiento (P=0.17).

Amonio

No se encontró que los factores de estudio interactuaran en la concentración de amonio a las 0 (p=0.71),4 (p=0.37) u 8 horas(p=0.17). El tipo de procesamiento del grano de maíz no afectó la concentración de NH₃-N a las 0 (p=0.17), 4 (p=0.21) u 8 horas (p=0.175). De forma similar, no se detectó que la monensina sódica afectara estadísticamente la concentración de NH₃-N para ninguna de las horas de estudio (0 (p=0.28), 4 (p=0.70) u 8 horas (p=0.12)).

Ácidos grasos volátiles

Concentración total de Ácidos grasos volátiles (AGVT)

No se detectó interacción de los factores de estudio en las concentraciones totales de ácidos grasos volátiles (AGVT) del líquido ruminal a las 0 (p=0.78), 4 (p=0.28) u 8 horas (p=0.34). De igual forma, no se detectó efecto simple de la monensina a las 0 (p=0.36), 4 (p=0.96) y 8 horas (0.83) ni efecto del procesamiento del grano de maíz para ningún tiempo de muestreo (0 (p=0.16),4 (p=0.59) u 8 horas (p=0.12)).

Porcentaje molar de acetato

No hubo interacción entre procesamiento y monensina en el porcentaje molar de acetato a las 0 ($p=0.94$), 4 ($p=0.51$) u 8 horas ($p=0.87$). Sin embargo, la monensina disminuyó significativamente el porcentaje molar de acetato las 0 ($P<0.01$) y a las 4 horas ($P<0.05$), mientras que tendió a hacerlo a las 8 horas ($p=0.094$). No hubo efecto del factor procesamiento del grano de maíz (molido o rolado) sobre el porcentaje molar de acetato en ningún tiempo de muestreo (0 ($p=0.19$), 4 ($p=0.398$) u 8 horas ($p=0.84$)).

Porcentaje molar de propionato

Para esta variable no se detectó interacción a las 0 horas ($p=0.34$), sin embargo, la proporción molar de este ácido aumentó ($P<0.01$) por efecto de monensina, aunque no por efecto del procesamiento del maíz ($p=0.79$). Se detectó interacción procesamiento*monensina para la proporción molar de propionato a las 4 horas ($P<0.05$) y tendencia de interacción a las 8 horas ($P=0.096$).

Relación Acetato: Propionato

No se encontró interacción de los factores de estudio ($P*M$) para la variable relación acetato: propionato a las 0 ($p=0.42$); 4 ($p=0.23$) u 8 horas ($p=0.30$). Dicha variable disminuyó a las 0 ($P<0.01$), 4 ($P<0.01$) y 8 horas ($P<0.05$) por efecto de monensina sódica, pero no por efecto del procesamiento del grano de maíz (0 horas ($p=0.36$), 4 horas ($p=0.37$) u 8 horas ($p=0.74$)).

Porcentaje molar de butirato

No se observó interacción a las 0 ($p=0.45$), 4 ($p=0.13$) u 8 horas ($p=0.33$) en el porcentaje molar de este ácido. En el tiempo 0 postprandial, el procesamiento rolado disminuyó el porcentaje molar de butirato ($P<0.05$) mientras que la monensina lo aumentó ($p<0.05$). No se observó efecto de la monensina a las 4 ($p=0.38$) u 8 horas (0.93); así mismo, tampoco se detectó efecto del tipo de procesamiento del grano de maíz a las 4 ($p=0.38$) y a las 8 horas ($p=0.60$).

Protozoarios

Los resultados de la concentración de protozoarios (células /10⁵) se muestran en el cuadro 5.1. No se detectó interacción en ningún tiempo de muestreo (0 (P=0.95), 4 (P=0.299) u 8 horas (p=0.857)). Sin embargo, a las 4 horas se detectó que los conteos disminuyeron por efecto de la inclusión de grano roado (P<0.05), mientras que tendieron a disminuir por acción de la monensina (P=0.077).

Abundancia de *archaeas* metanogénicas

En el presente estudio, la densidad de las poblaciones de *archaeas* metanogénicas no fue afectada en ninguno de los tiempos postprandiales (0,4 u 8 horas) en respuesta a la inclusión de monensina sódica (0 vs 21 mg/kg MS), al procesamiento del grano de maíz o la interacción de ambos factores (p>0.1).

Cuadro 5.1. Efecto de la monensina y procesamiento del grano de maíz sobre la fermentación ruminal y poblaciones microbianas de novillos a 0, 4 y 8 h postprandiales.

Variables	Procesamiento (P) ¹				EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
	Molido		Rolado					
	Monensina sódica (M) ²							
	-	+	-	+	⁶ p < 0.05			
0 h postprandiales	A	B	C	D	EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
pH	6.78	6.73	6.77	6.62	0.041	0.23	0.06	0.27
N-NH ₃ , mg/ 100 ml	5.34	6.54	6.82	7.43	0.764	0.17	0.28	0.71
Protozoarios, células ml ⁻¹ x 10 ⁵	4.59	3.77	4.03	3.32	9.37*10 ⁴	0.61	0.45	0.95
⁵ Metanogénos, log copias ml ⁻¹	9.32	9.56	9.55	9.62	0.185	0.47	0.43	0.68
4 h postprandiales	A	B	C	D	EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
pH	5.81	5.8	5.63	5.69	0.09	0.17	0.78	0.70
NH ₃ -N, mg/ 100 ml	31.33	24.2	19.15	22.04	5.16	0.214	0.70	0.37
Protozoarios, células ml ⁻¹ x 10 ⁵	3.56	2.60	2.21	1.92	2.93*10 ⁴	0.013	0.077	0.30
⁵ Metanogénos, log copias ml ⁻¹	9.50	9.50	9.50	9.58	0.14	0.775	0.79	0.78
8 h postprandiales	A	B	C	D	EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
pH	5.85	5.77	5.84	5.58	0.064	0.17	0.04	0.22
NH ₃ -N, mg/ 100 ml	5.30	5.50	2.82	5.52	0.80	0.175	0.12	0.17
Protozoarios, células ml ⁻¹ x 10 ⁵	3.63	3.10	2.98	2.08	9.98*10 ⁴	0.44	0.498	0.86
⁵ Metanogénos, log copias ml ⁻¹	9.49	9.61	9.42	9.66	0.12	0.95	0.185	0.62

¹ Procesamiento del grano de maíz.

² Inclusión de monensina sódica 21 mg/kg MS dieta.

³ Interacción Monensina*Procesamiento

⁴Error estándar media

⁵Log del número de copias del gen *mcrA* por mililitro

⁶ Nivel de significancia estadística

Cuadro 5.2. Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre el patrón de los ácidos grasos volátiles del líquido del rumen de novillos a 0, 4 y 8 h postprandial.

Variables	Procesamiento (P) ¹				EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
	Molido		Rolado					
	Monensina sódica (M) ²							
	-	+	-	+				⁶ p < 0.05
0 h postprandial	A	B	C	D				
AGVT, mmol	59.68	64.27	68.36	76.84	6.58	0.16	0.36	0.78
	% molar							
Acetato	64.76	57.88	66.57	59.91	1.29	0.19	<0.01	0.94
Propionato	20.55	24.83	19.60	25.37	0.72	0.79	<0.01	0.34
Butirato	9.04	10.69	8.21	9.16	0.44	0.036	0.0255	0.45
Relación Ac:Pr	3.17	2.35	3.48	2.37	0.17	0.36	<0.01	0.42
4 h postprandial	A	B	C	D	CME ⁵	P ¹	M ²	PxM ³
AGVT mmol	112.96	120.51	124.66	116.42	147.56	0.59	0.96	0.28
	% molar							
Acetato	57.26	53.18	57.5	55.1	4.68	0.398	0.04	0.51
Propionato	23.64	24.42	22.08	25.57	0.83	0.69	<0.01	0.04
Butirato	15.07	18.12	16.01	15.07	4.07	0.38	0.38	0.13
Relación Ac:Pr	2.43	2.19	2.61	2.16	0.02	0.37	<0.01	0.23

¹ Procesamiento del grano de maíz.

² Inclusión de monensina sódica 21 mg/kg MS dieta.

³ Interacción monensina*procesamiento

⁴ Error estándar de la media

⁵ Se reportó el cuadrado medio del error debido a la eliminación de una observación del tratamiento B.

⁶ Nivel de significancia estadística

Cuadro 5.2 Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre el patrón de los ácidos grasos volátiles del líquido del rumen de novillos a 0, 4 y 8 h postprandial (Continuación)

Variables	Procesamiento (P) ¹				EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
	Molido		Rolado					
	Monensina sódica (M) ²							
	-	+	-	+				
8 h postprandial	A	B	C	D				
AGVT, mmol	111.55	107.76	115.12	121.03	4.69	0.12	0.83	0.34
	% molar							
Acetato	59.59	56.03	59.51	55.29	1.96	0.84	0.094	0.87
Propionato	22.33	23.88	21.46	27.02	1.01	0.31	0.013	0.096
Butirato	14.66	15.84	15.28	13.86	1.23	0.60	0.93	0.33
Relación Ac:Pr	2.68	2.37	2.84	2.07	0.20	0.74	0.037	0.30

¹ Procesamiento del grano de maíz.

² Inclusión de monensina sódica 21 mg/kg MS dieta.

³ Interacción monensina* procesamiento

⁴ Error estándar media

⁵ Nivel de significancia estadística

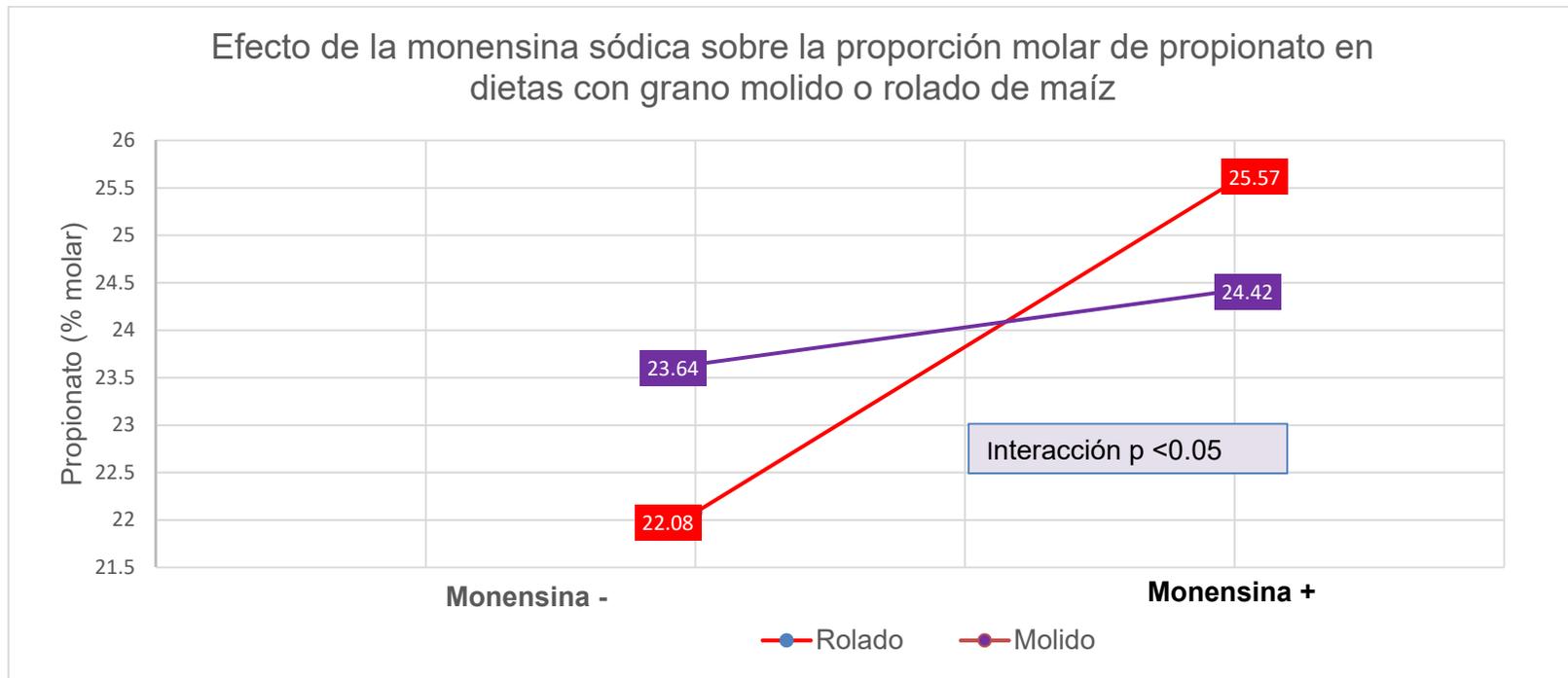


Figura 5.1. Efecto del procesamiento del grano de maíz y la inclusión de monensina sódica sobre la proporción molar de propionato a las cuatro horas después de la alimentación. Ambos factores interactuaron ($p < 0.05$). El incremento en la proporción molar de propionato por efecto de monensina fue de mayor magnitud cuando se incluyó maíz rolado en las dietas.

Experimento 2 Producción *in vitro* de gas y metano

Producción *in vitro* de gas y metano por la técnica de Menke y Steingass

En el cuadro 5.3, se muestran los resultados para la producción *in vitro* de gas y CH₄ con la técnica de Menke y Steingass (1988). Se detectó que los factores de estudio tendieron a interactuar en la producción total de gas (P=0.07), pero no en la producción de metano (P=0.94). El volumen producido de metano (ml/g MS) disminuyó (p<0.01) por efecto de la monensina, pero no por efecto del procesamiento del grano de maíz (p=0.20). El porcentaje de metano en el gas de la muestra no fue afectado por los tratamientos experimentales (P>0.1).

Cinética de producción de gas (CPG) con el sistema de monitoreo de producción de gas AMKOM

En el cuadro 5.4 se muestran los resultados de la CPG. Los datos se ajustaron mejor a un modelo monomolecular, indicando que la tasa de digestión es intrínsecamente lineal, es decir, que es constante e independiente de la cantidad del sustrato remanente según avanza el tiempo de fermentación (figura 5.2). No se detectó interacción (procesamiento*monensina) en la producción total *in vitro* de gas (p=0.93). El procesamiento molido del grano de maíz produjo volúmenes mayores de gas que el procesamiento rolado (p<0.01), mientras que la monensina no tuvo efecto (p=0.18). Se detectó una tendencia de interacción para la tasa de digestión entre monensina y el procesamiento (p=0.07), siendo que el incremento en la tasa de digestión por efecto de la monensina fue mayor cuando el sustrato fue maíz rolado (18.87% ;6.02 vs 7.42 %h⁻¹), comparado al efecto de la monensina cuando el sustrato fue maíz molido (1.53 % ;6.45 vs 6.55 %h⁻¹).

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

En el cuadro 5.3 se muestran los resultados para la DIVMS. Los factores de estudio no interaccionaron (p=0.95), y tampoco modificaron la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de las dietas experimentales (procesamiento p=0.96 y monensina p=0.40)

Simulación del efecto de la monensina sódica y del procesamiento del grano de maíz en la producción *in vivo* de metano por novillos.

En el cuadro 5.5, se muestran los resultados de la simulación de la producción de metano por los novillos. El CMS no fue afectado por los tratamientos debido a que fue fijado al 1.8% del peso vivo de los animales. Como el consumo de energía bruta se obtiene en función del consumo de materia seca multiplicado por la estimación del contenido energético de un kg de alimento (Mc Donald *et al.*, 1995), éste tampoco fue afectado. No se encontró interacción de los factores de estudio sobre la producción de CH₄ (litros/día) por parte de los novillos (p=0.95), en la cantidad de energía bruta (Mcal) que representa el CH₄ producido (p=0.95) o en el porcentaje de energía perdida en forma de metano (p=0.87). El procesamiento del maíz no afectó la producción de metano en litros/día y la energía bruta que representa el metano (p=0.17), y, por otro lado, la monensina disminuyó significativamente ambas variables (p<0.01). La energía perdida en forma de metano como proporción del total de la energía bruta consumida por los animales no fue afectada por el procesamiento del grano de maíz (p=0.21), pero si disminuyó por efecto de monensina (p<0.01). Por otro lado, usando el modelo propuesto por Wolin (1960) no se detectó interacción ni efecto de los factores de estudio (p>0.1).

Cuadro 5.3 Efecto de la Monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la producción *in vitro* de gas, metano y la DIVMS.

Variable	Procesamiento (P) ¹				EEM ⁴	P ¹	M ²	P x M ³
	Molido		Rolado					
	Monensina sódica (M) ²							
	-	+	-	+				
	A	B	C	D				
Gas total, ml/g MS	215.15	171.7	202.9	190.9	7.04	0.64	<0.01	0.07
Gas total, ml/ g MSD ⁵	276.2	217.2	261.1	242.6	10.40	0.64	<0.01	0.10
Metano, ml/g MS	51.9	43.75	50.05	40.82	1.95	0.29	<0.01	0.85
Metano, ml/g MO	56.57	47.62	54.3	44.55	2.09	0.28	<0.01	0.92
Metano, % gas total	13.32	13.03	13.06	11.97	0.51	0.22	0.21	0.43
DIVMS ⁶	77.83	79.02	77.81	79.2	0.71	0.96	0.40	0.95

¹ Procesamiento del grano de maíz.

² Inclusión de monensina sódica 21 mg/kg MS dieta.

³ Interacción procesamiento * monensina

⁴ Error estándar media

⁵ Materia seca digestible

⁶ Digestibilidad *in vitro* de la materia seca a las 48 horas de incubación, (%)

⁷ Nivel de significancia estadística

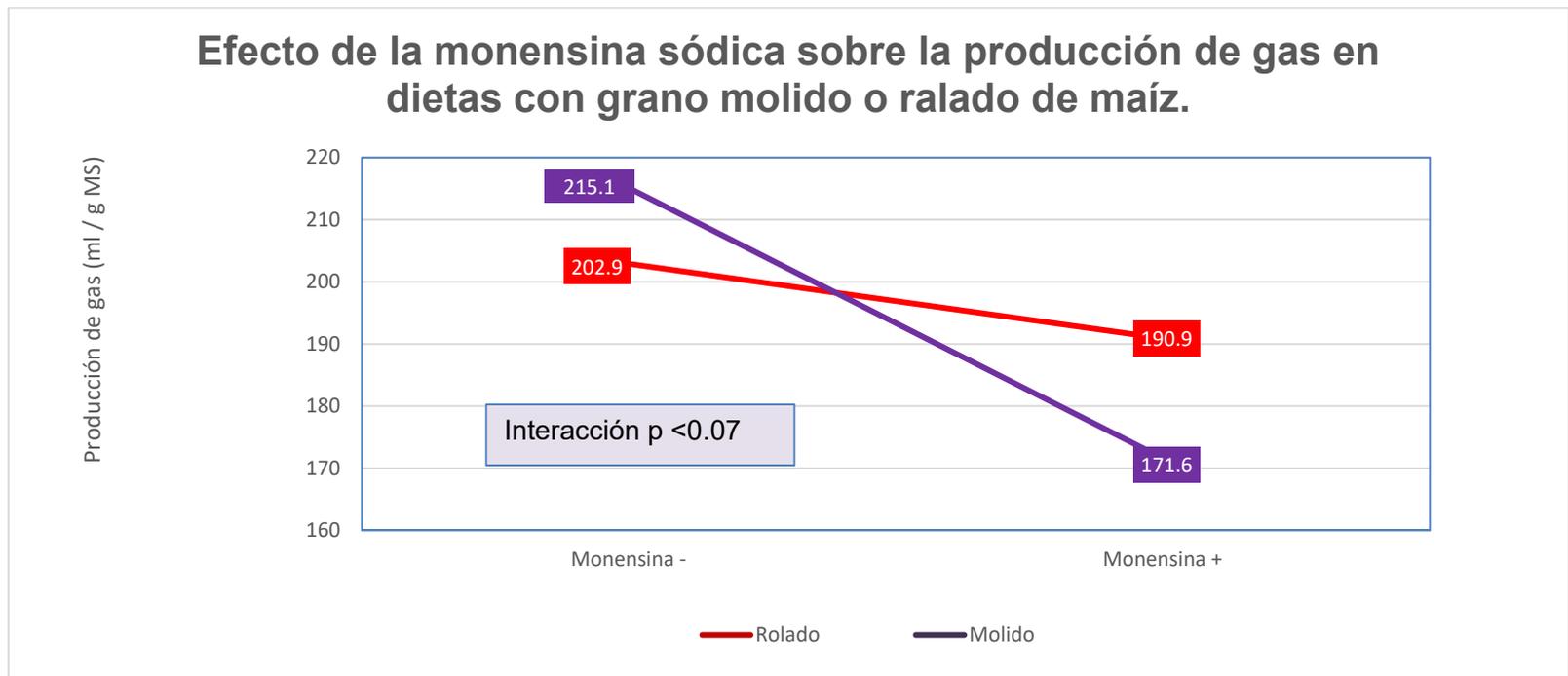


Figura 5.2 Efecto del procesamiento del grano de maíz y la inclusión de monensina sódica sobre la producción de gas *in vitro* con la técnica de Menke y Staingass. Se detectó tendencia de interacción entre los dos factores de estudio. La monensina redujo la producción total de gas, pero el efecto fue de magnitud mayor cuando las dietas contenían maíz molido ($p < 0.07$)

Cuadro 5.4 Efecto de la Monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la cinética de la producción *in vitro* de gas de acuerdo con el modelo monomolecular.

Parámetro	Procesamiento (P) ¹				EEM ⁴	P ¹	M ²	P×M ³
	Molido		Rolado					
	Monensina sódica (M) ²							
	-	+	-	+				
	A	B	C	D				⁷ p <0.05
PGT ⁵ , ml 48/ h	281.67	273.16	253.42	245.79	7.23	<0.01	0.177	0.93
Tasa ⁶ , ml h ⁻¹	6.45	6.55	6.02	7.42	0.27	0.27	0.0147	0.069

¹ Procesamiento del grano de maíz

² Inclusión de monensina sódica (21 mg/kg MS)

³ Interacción Procesamiento*monensina

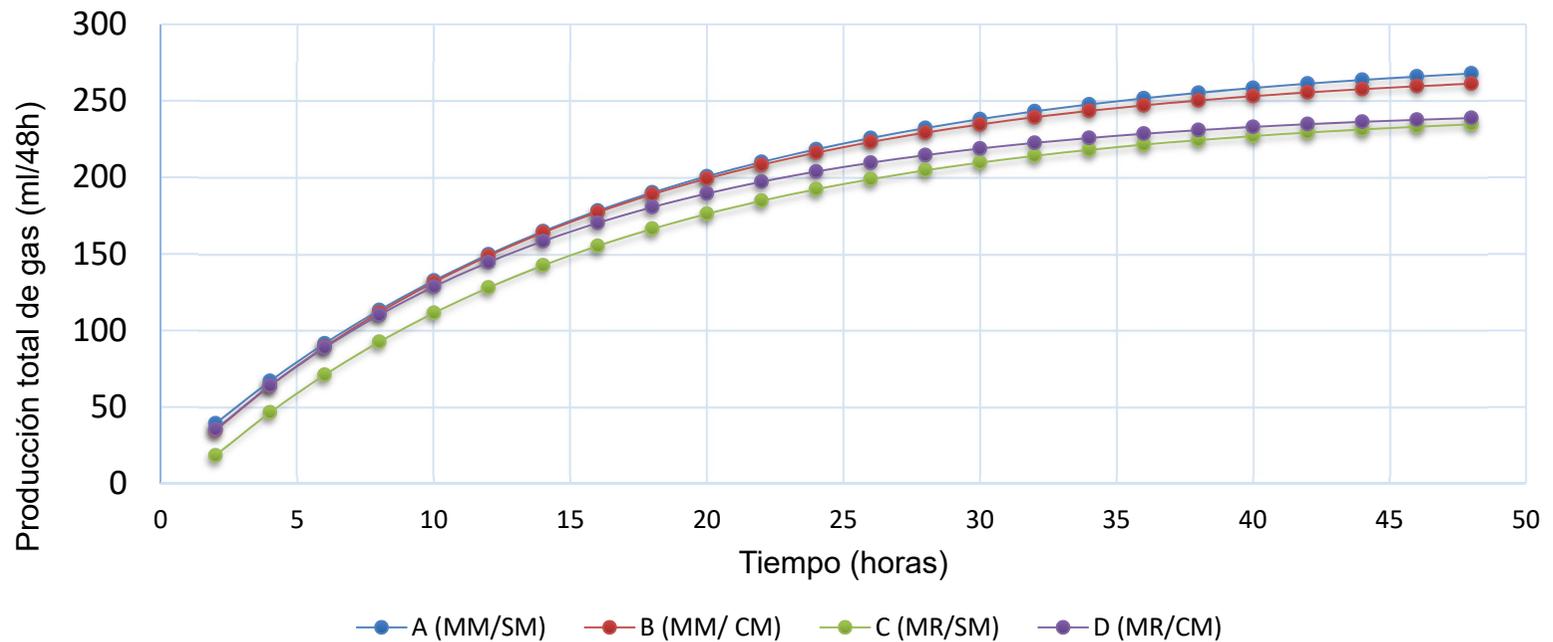
⁴ Error estándar de la media

⁵ Producción total de gas

⁶ Tasa de producción de gas

⁷ Nivel de significancia estadística

Figura 5.3 Grafica de producción total de gas (ml/48 h) vs tiempo de acuerdo con el modelo exponencial monomolecular.



MM/SM= Maíz molido sin monensina
 MM/CM= Maíz molido con monensina

MR/SM=Maíz rolado sin monensina
 MR/CM= Maíz rolado con monensina

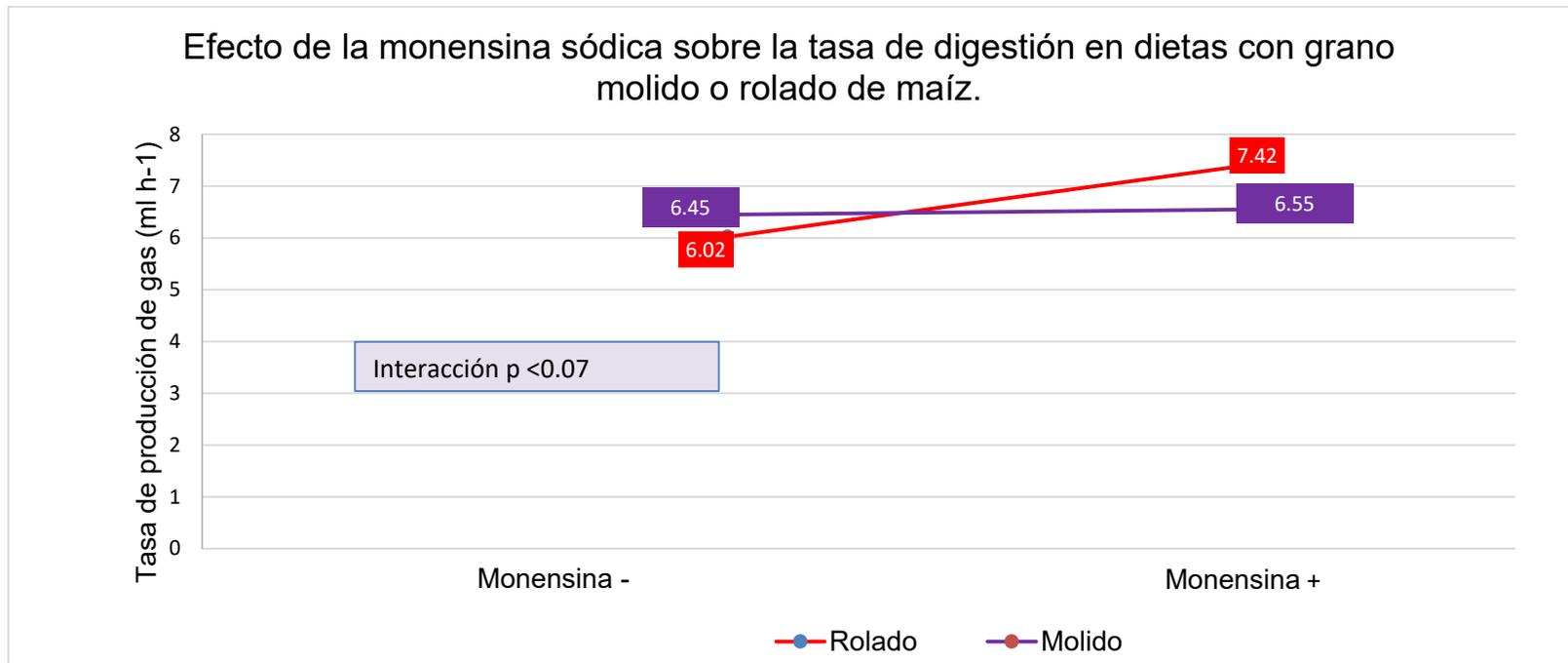


Figura 5.4. Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la tasa de digestión. Se detectó tendencia de interacción de los factores de estudio ($p=0.07$). La monensina sódica incrementó la tasa de digestión del sustrato con mayor magnitud cuando la dieta contiene maíz rolado.

Cuadro 5.5. Simulación del efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz en la producción de metano por novillos.

Variable	Procesamiento (P) ¹				EEM ⁴	P ¹	M ²	PxM ³
	Molido		Rolado					
	Monensina sódica (M) ²							
	-	+	-	+				
	A	B	C	D				⁹ p <0.05
Consumo materia seca, kg	14.95	14.89	14.72	14.81	0.15	0.30	0.94	0.63
Consumo energía bruta, Mcal ⁵	65.8	65.53	64.76	65.13	0.64	0.30	0.94	0.63
Producción metano, L ⁶	775.16	654.07	732.52	612.4	28.58	0.17	<0.01	0.95
Energía bruta metano producido, Mcal ⁷	6.64	5.60	6.28	5.24	0.25	0.17	<0.01	0.95
Energía metano / energía consumida, %	10.11	8.52	9.71	8.01	0.37	0.21	<0.01	0.87
CH ₄ , mol/mol glucosa	0.347	.336	.34	0.33	0.0042	0.89	0.09	0.39

¹ Procesamiento del grano de maíz.

⁹ Nivel de significancia estadística

² Inclusión de monensina sódica 21 mg/kg MS dieta.

³ Interacción monensina* procesamiento

⁴ Error estándar media

⁵ Se asumió que un kilogramo de alimento contiene 18.5 MJ (4.4 Mcal/kg) (Mc Donald *et al.* 1995).

⁶ Se calculó como CMS*valor emisión (CH₄ ml/g MS). Valor emisión=los valores de producción de metano determinados en la prueba *in vitro* para cada dieta (Cuadro 5.3).

⁷ El calor de combustión del metano es 11.95 Mcal/kg ó 1.65 Mcal/ L de metano.

⁸ Calculado con el modelo propuesto por Wolin (1960).

CAPÍTULO VI DISCUSIÓN

Experimento 1

pH del líquido del rumen.

De acuerdo con Mc Donald *et al.* (1995), en condiciones normales el pH del rumen es mantenido entre 5.5 a 6.5, debido a la acción de fosfato y bicarbonato que son aportados por la saliva y por la absorción de los ácidos grasos volátiles a través de la pared del rumen. Sin embargo, aún las fluctuaciones del pH dentro de estos rangos determinan la extensión de la degradación de las proteínas, la sobrevivencia de algunos grupos de bacterias, la biohidrogenación de las grasas o las rutas metabólicas predominantes.

Efecto de la monensina sódica sobre el pH del líquido del rumen

El efecto de la monensina sobre el pH no ha sido consistente y depende del tipo de dieta (Schelling, 1984). En dietas altas en granos (70 a 80%), se ha observado que el pH es mayor en los animales suplementados con monensina (Nagaraja *et al.*, 1981; Shell *et al.*, 1983). Este efecto puede ser explicado porque la monensina afecta a las bacterias productoras (vg *Streptococcus Bovis*) de lactato (Russell y Strobel, 1989). El lactato tiene un pka más bajo (3.9) que el pka (4.8) de los AGV, lo que explica en parte porque el pH se eleva con la adición de la monensina.

Tal como lo sugiere Knowlton *et al.* (1996), la disminución del pH ruminal por efecto de la monensina podría estar mediada por la disminución del número de protozoarios. La capacidad que tienen éstos para ingerir almidón se puede considerar un medio para amortiguar el pH ruminal, considerando que una menor cantidad de almidón estaría disponible para bacterias que producen lactato (v.g. *S. bovis*). (Van Soest, 1994).

Como resultado del proceso de experimentación en éste estudio, monensina disminuyó el pH del líquido ruminal a las 0 y 8 horas, pero no a las 4. Lana y Russell (1997) reportaron disminución del pH con la suplementación de monensina, pero en dicho estudio no se discutió la explicación. Zinn *et al.* (1994) sugieren que el efecto de la monensina podría deberse a la disminución de la tasa de paso de sólidos y la tasa de dilución, lo que incrementaría la extensión de la digestión, disminuyendo el pH. En otros estudios (Knowlton *et al.*, 1996; Mathew *et al.* 2011), donde se suplementó lasolacida o monensina

respectivamente a animales recibiendo dietas con ensilado y granos, no se detectaron diferencias estadísticas en el pH del rumen por la adición de los ionóforos.

Efecto del procesamiento del grano de maíz sobre el pH del líquido ruminal

En el caso del grano molido, debido al menor tamaño de partícula resultante hay mayor exposición de los gránulos de almidón incrementando la superficie para el ataque microbiano y aumentando la tasa de producción de lactato (Gimeno *et al.*, 2015). Al respecto, Maldonado (1996) reportó que novillos Brahman recibiendo dietas 15:85 Forraje: concentrado que consumieron maíz rolado mostraron un pH más bajo (6.07) que los animales alimentados con maíz molido (6.13); sin embargo, la diferencia puede considerarse pequeña respecto a la variación reportada (EEM= 0.04), debido a que se esperaba que el grano rolado disminuyera el pH del rumen ya que este proceso incrementa la disponibilidad del almidón alterando la matriz proteica del grano. Gimeno *et al.*, (2015) reportaron que la molienda del maíz resultó en la disminución del pH ruminal en comparación con el grano rolado. Al respecto, y de acuerdo con esta investigación, una posible explicación podría estar relacionada con los niveles de forraje y grano utilizados en las dietas, y de acuerdo con esto, el forraje prolonga el tiempo de rumia, resultando en mayor salivación, lo que es un factor que pudo ocultar las diferencias entre los tipos de procesamiento (Zinn, 1987). Adicionalmente al efecto de la salivación, la capacidad amortiguadora del forraje, la inclusión de bicarbonato de sodio, la sustancial cantidad de fibra en la dieta (>30%) pudieron haber contribuido a mantener estable el pH. Sin embargo, Callison *et al.* (2001) reportaron un efecto cuadrático del tamaño de partícula sobre el pH del líquido del rumen en dietas que contenían maíz molido en diferentes tamaños, pero la explicación del efecto no fue definida.

La extensión de la digestión ruminal y la fracción de sobrepaso dependen de dos factores, tasa de pasaje (tp , % h^{-1}) y tasa de digestión (td , % h^{-1}) siendo la ecuación que determina la extensión la que desarrolló Van Soest (1994):

$$\text{Extensión digestión (\%)} = \frac{td}{(td + tp)}$$

Si la td se incrementa por efecto del procesamiento y sin cambio en la tp , se puede esperar que extensión de la digestión se incremente. En contraste, si la tp aumenta por

efecto del tratamiento, sin cambios en la td , la extensión de la digestión disminuirá, aumentando la fracción de sobrepaso. No obstante, ambos factores podrían ser afectados al mismo tiempo, por lo que la extensión de la digestión dependerá de la magnitud de los cambios en cada una de las tasas de digestión o pasaje.

No obstante la aseveración de Zinn *et al.*, (2011), en la cual se expone que cuando disminuye el tamaño de las partículas, la tasa de paso aumenta, Maldonado (1996) replicó que el grano rolado tuvo una tasa de pasaje más rápida ($2.92 \% h^{-1}$) que el grano molido ($2.52 \% h^{-1}$). En esta misma discusión, Rémond *et al.*, (2004) sostienen que no hubieron cambios en la tasa de pasaje (4.27 a $5.16\% h^{-1}$) a pesar de las diferencias en el tamaño de partículas de granos molidos o rolados fino y grueso. Knowlton *et al.* (1998), quien reportó no haber detectado diferencias estadísticas en el pH de animales alimentados con maíz molido o rolado, sugiere que los efectos contrarios de las tasas de digestión y de pasaje podrían tener más peso en ganado lechero por los altos consumos y las altas tasas de paso asociadas con ello; Por esta razón, los efectos de la molienda podrían no ser los esperados en pruebas *in vivo* con ganado lechero.

Rémond *et al.* (2004) muestran claramente como la degradabilidad efectiva *in situ* del almidón del grano de maíz en el rumen disminuye por efecto del tamaño de partícula, donde molido (0.7 mm), rolado fino (1.8 mm) o rolado grueso (3.7 mm), tuvieron 61.6%, 56.6 y 49.6% como valores estimados de degradabilidad respectivamente. A pesar de las diferencias en degradabilidad, las cuales pueden ser explicadas por los cambios en las tasas de digestión debido a los procesamientos, el pH del líquido ruminal no difirió entre los diferentes tamaños de partícula.

Concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

En general las concentraciones de N-NH₃ fueron mayores al nivel mínimo requerido por los microbios para que su crecimiento no se limite (>5 mg NH₃-N/100 ml; Satter y Slyter 1974; Roffler y Satter 1974). A las 4 horas postprandiales, las concentraciones superaron los 20 mg N-NH₃ /100 ml., pero a las 8 horas ya habían retornado a los niveles preprandiales. Esta disminución rápida indica que había suficiente energía disponible y NH₃-N para el crecimiento microbiano (NRC, 1985; Roffler y Satter, 1974).

Efecto de la monensina sódica sobre la concentración de nitrógeno amoniacal.

En este estudio, las concentraciones de nitrógeno amoniacal no fueron afectadas por la monensina como lo sugieren los autores Muntifering *et al.* (1980), Surber y Bowman (1998) y Guan *et al.* (2006) en estudios *in vivo*; así como Russell y Strobel (1988), Wischer *et al.* (2013) y Narvaez *et al.* (2013) en estudios *in vitro* quienes manifiestan que el ionóforo causa disminución. Van Nevel y Demeyer (1977), Wallace *et al.* (1981) y Yang y Russell (1993) indican los ionóforos reducen la degradación ruminal de péptidos y la desaminación de los aminoácidos, inhibiendo específicamente las bacterias gram+ y protozoarios. Así mismo, se ha reconocido la monensina puede disminuir la proteólisis (Van Soest, 1994). En conclusión a este respecto, aunque la literatura establece que la monensina si disminuye la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$, y así mismo, existe otra postura que indica que no hay disminución (Mathew *et al.*, 2011; Benchaar, 2015), y de hecho puede aumentarla (Lana y Russell 1997), en este estudio en función de los resultados obtenidos, no fue detectado efecto de la monensina sobre la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$. Esto se debió a que la monensina solo disminuye la degradación de proteína verdadera pero no la captación de NNP por las bacterias, por lo que en dietas basadas en ingredientes como el silo de maíz como se realizó en este estudio, el ionóforo podría tener poca utilidad para disminuir las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ debido a su contenido variable de NNP (Van Soest, 1994).

Efecto del procesamiento del grano de maíz sobre la concentración de Nitrógeno amoniacal

El procesamiento de los granos disminuye la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ del rumen debido a que hay una mayor cantidad de almidón fermentable, lo cual aumenta la energía para el crecimiento microbiano y se traduce en mayor captación de $\text{NH}_3\text{-N}$ por los microbios (Van Soest, 1994). En términos de este estudio, se encontró que el factor procesamiento no afectó las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$. Esto puede sugerir que el efecto del procesamiento puede verse afectado por otras variables como por ejemplo el nivel de inclusión del grano en la dieta, el genotipo del grano o el consumo. Así mismo, Knowlton *et al.* (1998) evaluaron el efecto de dos métodos de conservación del grano de maíz (seco vs maíz de alta humedad) y dos procesamientos (molido 6.4 mm vs rolado 0.58 mm). Los autores no detectaron efecto del procesamiento sobre las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ y lo atribuyeron a diferencias en la tasa de paso del maíz relacionadas con el alto consumo de los animales lecheros.

Rémond *et al.* (2004) realizaron dos experimentos, en el primero reportaron un incremento lineal de la concentración de amonio cuando aumenta el tamaño de partícula con dietas para ganado lechero que contenían 35% de maíz semiharinoso (*semiflint*). En el segundo experimento, el genotipo del maíz fue cambiado de semiharinoso a dentado (*dent*), y se aplicaron dos procesos mecánicos (Molido 3 mm vs Rolado). A pesar de una diferencia importante en la cantidad de almidón fermentado en el rumen (~ 1Kg), no detectaron diferencias en las concentraciones de amonio, pH y AGVT. Esto comprueba lo que se dijo anteriormente, que el efecto del procesamiento puede verse afectado por otras variables, entre ellas el genotipo del grano.

Patrón y concentración de los ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal.

La concentración de AGV en el líquido ruminal es el resultado del balance entre su producción y absorción a través del epitelio del rumen. Por otro lado, el patrón o proporción de cada ácido se ve influido por factores como la naturaleza de la dieta, especies microbianas presentes o tasa de despolimerización (Church, 1988). El patrón resultante de AGV puede influir en la cantidad de CH₄ producido porque las vías bioquímicas asociadas a la producción de los distintos AGVs pueden actuar como productoras o pozas de H₂. Así, la producción de propionato consume H₂ y compite con la metanogénesis, mientras que la producción de acetato y butirato está asociada con el suministro de H₂ (Moss *et al.*, 2000; Ungerfeld y Kohn 2006).

Efecto de la monensina sódica sobre la concentración total de ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal (AGVT).

La monensina no provocó un cambio estadísticamente significativo de la concentración total de AGV, lo cual ha sido reportado en varios estudios *in vivo* (Thornton y Owens 1981; Jalč *et al.*, 1992; Yang y Russell 1993; Surber y Bowman 1998; Guan *et al.*, 2006). De igual forma, en un meta-análisis Ellis *et al.* (2012) concluyeron que la monensina incluida en dosis en el rango de 0 y 79 mg/kg de MS no afecta la concentración total de AGV. Estos datos concuerdan con ese estudio, donde una dosis de 21 mg/Kg no afectó la concentración total de AGV.

Efecto del procesamiento del grano de maíz sobre la concentración total de ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal (AGVT).

El efecto principal del procesamiento de los granos es aumentar la disponibilidad de almidón para las bacterias del rumen, lo que resulta en un incremento de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), especialmente en una mayor proporción de propionato, respecto al acetato (Orskov, 1986). En el presente estudio, no se detectaron diferencias en la concentración total de AGV en el líquido ruminal por efecto de los procesamientos molido o rolado del maíz para ningún tiempo de muestreo. Esto concuerda con datos publicados en otros estudios donde se ha evaluado el tamaño de partícula, o el procesamiento molido o rolado en seco (Knowlton *et al.*, 1996; Knowlton *et al.*, 1998; Callison *et al.*, 2001; Rémond *et al.*, 2004). En estos estudios se sugiere que la falta de efecto del procesamiento mecánico o tamaño de partícula se debe a que podría haber cambios en la tasa de pasaje que aumenten el escape de partículas hacia el tracto posterior, principalmente del maíz molido ya que la disminución del tamaño de partícula incrementó linealmente la tasa de pasaje desde el rumen (Ewing *et al.*, 1986).

En contraste, Gimeno *et al.* (2015), reportaron que el rolado del maíz reducía la concentración de ácidos grasos volátiles y láctico e incrementaba el pH en el rumen, en comparación con el maíz molido. Estos autores sugirieron que la disponibilidad del almidón podría ser menor porque las partículas del grano rolado tienen un mayor tamaño. El incremento del propionato y, a su vez, del lactato se ha asociado con el incremento de *Selenomonas ruminantium*, una especie que produce propionato en el rumen como uno de sus productos terminales. No obstante, los mismos autores reportaron que el maíz rolado favoreció el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*, y no hubo diferencias en la concentración de lactato o AGV totales.

Efecto de la monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre el patrón de ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal.

El efecto de la monensina fue consistente con lo reportado por la literatura para las proporciones molares de acetato y propionato en los tres tiempos de muestreo. En el tiempo 0, no se detectó que hubiera una interacción entre la monensina y el procesamiento del maíz; sin embargo, persistió el efecto inhibitorio de la suplementación de monensina del día previo sobre el porcentaje molar de acetato, la promoción de una mayor producción de

propionato y, en consecuencia, la disminución significativa de la relación acetato: propionato. Abrar *et al.* (2015) estudiaron el efecto del retiro de monensina con novillas cruzadas Holstein x Negra japonesa que eran alimentadas con pasto *ryegrass* italiano y concentrado comercial con 30 ppm de monensina y reportaron que un día después del retiro de la monensina, se mantuvo su efecto aumentando el porcentaje molar de propionato y disminuyendo el acetato, resultando en una disminución de la relación acetato: propionato. Estos cambios podrían explicar lo observado en el tiempo 0 del presente estudio, ya que los animales consumían rápidamente su ración dentro de las primeras 4 horas posteriores al suministro.

A las 4 y 8 horas postprandiales, la monensina redujo la proporción molar de acetato, mientras que el procesamiento del maíz no afectó las proporciones de este ácido. La concentración molar de acetato fue un poco más baja que en otros estudios donde se alimentó con una dieta similar en los tres tiempos de muestro. Por ejemplo, Sauer *et al.* (1998) reportaron 62.9 % acetato, 24.9% propionato, 7.9 % Butirato y 2.6 relación acetato: propionato en animales recibiendo una dieta para ganado lechero.

En el mismo periodo de tiempo también se detectó una interacción entre procesamiento y monensina sobre la proporción molar de propionato. Hubo un mayor incremento cuando se incluyó monensina y el procesamiento del maíz fue rolado (22.08 vs 25.57 %), pero el incremento fue marginal cuando se incluyó monensina y la dieta contuvo grano molido (23.64 vs 24.41 %). Se puede sugerir que el procesamiento rolado podría romper la matriz proteica aumentando la tasa de digestión del almidón. Así mismo, Gimeno *et al.* (2015) reportaron que con el procesamiento rolado hay mayor abundancia de *S. ruminantium* un productor importante de propionato y que la monensina a su vez, a través de una selección positiva de microorganismos, aumenta el número de bacterias gram negativas (Narvaez *et al.*, 2013). Por lo tanto, el procesamiento rolado aumentó la disponibilidad de sustrato y la monensina el número de bacterias que pueden metabolizar ese sustrato y sintetizar propionato como producto terminal. En contraste, en un estudio similar al presente (Knowlton *et al.*, 1996), se evaluaron dos procesos del maíz (molido 827 μm vs quebrado 3265 μm) y el ionóforo lasolacida y no se detectó interacción de los factores de estudio sobre la proporción molar de propionato. El efecto de la monensina sobre las proporciones molares de acetato, butirato y la relación acetato:propionato está bien establecido (Bergen y Bates, 1984; Russel y Strobel 1989; Ellis *et al.*, 2012). La monensina

disminuye la proporción de acetato y butirato como resultado de la inhibición principalmente de microorganismos gram positivos y protozoarios. Respecto a los protozoarios, estos tienen un papel importante como productores de hidrógeno durante la digestión de la fibra (Van Soest, 1994), así es posible que se formen microambientes donde se favorece la acetogénesis, por lo que con su inhibición disminuye la producción de acetato y el H₂ se dirige hacia la producción de propionato. Los cambios en la producción de CH₄ *in vitro* son consistentes con la respuesta observada.

En el presente estudio, la monensina y el procesamiento afectaron diferencialmente el porcentaje molar de butirato en el tiempo 0, sin que hubiera una interacción entre ellos. Mientras que la monensina incrementó el porcentaje molar de butirato, el procesamiento lo disminuyó. Sin embargo, estos efectos no pueden ser explicados fácilmente. En la literatura, se ha demostrado que la monensina disminuye la proporción de este ácido graso (Ellis *et al.*, 2012), lo que ha sido atribuido al favorecimiento de las vías metabólicas que utilizan H₂. Por otro lado, en diferentes estudios donde se ha evaluado el procesamiento mecánico del maíz o diferentes tamaños de partícula no se ha detectado cambio de la proporción molar de butirato (Knowlton *et al.*, 1996; Knowlton *et al.*, 1998; Callison *et al.*, 2001; Rémond *et al.*, 2004; Gimeno *et al.*, 2015)

Aunque no se detectó efecto de los factores sobre las proporciones molares de butirato a las 4 y 8 horas postprandiales, es posible que las altas proporciones molares observadas sean reflejo de la presencia de cantidades importantes de ácidos orgánicos y azúcares solubles en el silo de maíz que al ser fermentados sobre todo por los protozoarios producen cantidades significativas de butirato (Van Soest, 1994). En una revisión (Bryant, 1979), se sugirió que cuando la concentración de H₂ se incrementa en el rumen y hay mayor presencia de MO degradable, se incrementa la tendencia de que los electrones generados en la fermentación en la forma de NADH sean utilizados en la conversión del piruvato en productos reducidos, sobre todo el propionato, a expensas de acetato y CO₂, y que se puede esperar el aumento de la concentración de otros productos como el butirato, valerato o caproato; en casos más extremos se comienza a detectar la presencia de lactato o etanol lo cual podría estar ligado a problemas nutricionales como la acidosis ruminal aguda o sub aguda. Por esta razón, el aumento de la proporción molar de butirato podría estar relacionado con una mayor cantidad de MO degradable.

Conteo de Protozoarios en el líquido ruminal.

Hungate (1966) demostró que el conteo de protozoarios en el líquido varía ampliamente (0.06 a 7.8×10^6 células/ml), sin embargo, la variación puede ser enorme aún para el mismo animal consumiendo la misma dieta en días diferentes (Eadie, 1959). Los protozoarios pueden constituir hasta 50% de la biomasa microbiana del rumen (Newbold *et al.*, 2015). Aunque su función no es clara, los efectos de la defaunación son diversos: incremento en el número de bacterias en el rumen, reducción del reciclaje de nitrógeno y aumento de la proteína microbiana que alcanza el duodeno; también se ha reportado que la defaunación provoca que disminuya la digestión de la fibra (Veira, 1986) o del almidón (Mendoza *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha encontrado que existe una estrecha relación entre los metanógenos y algunos protozoarios. En un estudio donde fueron usados ovinos defaunados (Krumholz *et al.*, 1983), se concluyó que los protozoarios mantienen la actividad de los metanógenos, lo cual podría ser a través del suministro de formato e H_2 . Debido a esta asociación se ha hipotetizado que los cambios en el número de protozoarios podrían reflejarse en cambios en la producción de metano (Demeyer y Van Nevel, 1979; Habib y Leng, 1986). Se ha sugerido que los efectos de la defaunación y los resultados benéficos o perjudiciales que conlleven para el animal podrían depender de la naturaleza de la dieta (Veira, 1986; Van Soest, 1994).

Efecto de la monensina sódica sobre el conteo de las poblaciones de protozoarios

En el presente estudio, solo pudo detectarse una tendencia de reducción en el conteo ($P < 0.08$) a las 4 h postprandiales y sin cambios significativos en los otros tiempos. Varios estudios (Bergen y Bates, 1984; Habib y Leng 1996; Castro-Montoya *et al.*, 2012) han mostrado claramente que la monensina reduce el número de protozoarios, sin embargo, el efecto no ha sido consistente siempre. Benchaar (2015) y Mathew *et al.* (2011) reportaron no haber detectado disminución significativa de las poblaciones de protozoarios en ganado lechero *in vivo*. Guan *et al.* (2006) estudiaron los efectos de dietas altas o bajas en concentrado, la inclusión de monensina, el efecto de alternar dos ionóforos y los cambios por el retiro de los ionóforos sobre las poblaciones de protozoarios. Independientemente del nivel del concentrado en la dieta, la monensina redujo a los protozoarios durante las primeras dos semanas; sin embargo, los conteos se restablecieron después de tres y seis semanas para las dietas altas y bajas en concentrado respectivamente, sugiriendo que esta población puede adaptarse y desarrollar resistencia al ionóforo. Aunque se conoce que la

variación en el conteo es considerable (3×10^5 a 1×10^6 células/ml; Veira 1986), se ha sugerido que varios factores (dieta, dosis, duración de la suplementación, método de conteo, tiempo de muestreo) afectan las poblaciones de protozoarios y su respuesta a la inclusión de monensina sódica.

Efecto del procesamiento del grano de maíz en el conteo de las poblaciones de protozoarios.

En el presente estudio, se encontró una correlación positiva entre el pH y el número de protozoarios a pesar de que no hubo diferencias estadísticas en el pH por efecto del procesamiento del maíz ($R^2=0.31$, $p<0.04$, $n=48$). Al respecto, Hook *et al.* (2011) reportaron que las densidades de las poblaciones de protozoarios aumentaron en animales diagnosticados con acidosis ruminal subclínica con relación a animales con pH ruminal mayor alimentados con forraje. De manera similar, Franzolin y Dehority (1996) encontraron que el número de protozoarios podría ser mayor en dietas con alto nivel de concentrado (de 3.19×10^5 con 100 % forraje a 7.35×10^5 con 75 % concentrado) pero el género *Entodinium* fue el que incrementó más sus números, a pesar de que el pH bajó a menos de 5.7 en los animales alimentados con 75% de concentrado. La bibliografía consultada y los resultados del presente estudio sugieren que el número de protozoarios disminuye según decrece el pH del líquido ruminal. Van Soest (1994) sugiere que los protozoarios son sensibles a pH bajos; Martin *et al.* (2009) reporta que el conteo de protozoarios disminuye dramáticamente cuando la dieta pasó a tener un contenido de almidón de 45 %, lo que podría estar relacionado a que engullen demasiado almidón y sufren lisis por un efecto osmótico (Van Soest, 1994). Sin embargo, los reportes de animales con SARA o niveles altos de concentrado, donde las poblaciones de protozoarios han aumentado, indican que la respuesta de la población de los protozoarios a los cambios en la composición de la dieta no es fácilmente predecible.

Densidad de las poblaciones de *archaeas* metanogénicas.

En el presente estudio, no se detectó efecto de la monensina, del tipo de procesamiento del grano de maíz o su interacción sobre la densidad de las *archaeas* metanogénicas para ningún tiempo de muestreo (0, 4 u 8 horas). El número de metanogénicos, determinado como el logaritmo del número de copias ml^{-1} , estuvo entre 10^8 a 10^9 metanógenos ml^{-1} en el

líquido ruminal; estos valores están en concordancia con el reportado por otros investigadores (Denman *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009). Es importante mencionar que existen pocos estudios donde se hayan evaluado estos factores, monensina y el procesamiento, *in vivo* de forma conjunta. Sin embargo, Zinn (1987) evaluó las características productivas de ganado de carne alimentado con dietas que contenían maíz hojueleado al vapor o maíz roloado en seco y tres ionóforos: lasolacida, monensina+tilosina o sin ionóforo. Empero, aunque la producción de CH₄ disminuyó, el estudio no evaluó cambios en las poblaciones microbianas por efecto de los tratamientos.

Efecto de la monensina sódica sobre las poblaciones de *archaeas* metanogénicas

Como fue mencionado en el párrafo anterior, no fue detectado efecto de la monensina en la densidad de las poblaciones de *archaeas* metanogénicas. En este tema, Chen y Wolin (1979) muestran que la monensina y lasolacida actúan en el rumen seleccionando *Bacteroides*, productor de succinato y *Selenomonas ruminantum*, un productor de propionato y, por otro lado, inhiben microorganismos productores de H₂. Aunque encontraron que estos antibióticos inhiben algunos metanogenos, en general estos fueron resistentes a dosis altas. En este tenor, en un estudio similar, la monensina no fue efectiva para disminuir la producción de CH₄ cuando se elevan las concentraciones de CO₂ y H₂ en el medio (Van Nevel y Demeyer, 1977), lo cual puede estar en concordancia respecto a que el H₂ es el metabolito central en la producción de CH₄ en el rumen y que el ionóforo no afecta sensiblemente a las *archaeas* metanogénicas (Van Nevel y Demeyer, 1977; Hook *et al.*, 2009).

En un estudio *in vivo*, Hook *et al.* (2009) estudiaron el efecto de la suplementación prolongada (180 d) de monensina (24 mg/kg MS) en vacas lecheras, no encontrando diferencias en el número o en la diversidad de *archaeas* metanogénicas, ya sea, por efecto de la monensina o del tiempo de muestreo a través del estudio (20, 90 ó 180 d).

De igual forma, Weimer *et al.* (2008) investigaron el efecto de la suplementación con monensina (13.9 mg/kg MS) y los cambios posteriores al retiro de ésta sobre la abundancia de varios grupos microbianos en ganado lechero, el cual fue alimentado con base en silos de maíz y de alfalfa y maíz alto en humedad. Encontraron que la población de *archaeas* no fue afectada por la monensina, y de igual modo, no se detectó efecto residual una vez

retirada la monensina del alimento. Los autores sugirieron que la monensina no inhibió selectivamente a los microorganismos gram positivos o que el H₂ requerido para la metanogénesis pudo haber sido suministrado por microorganismos resistentes, tales como protozoarios ciliados o los hongos.

Sin embargo, en un estudio *in vitro* (Abrar *et al.*, 2015), a pesar que tres días después de retirar el suministro de monensina y no detectar residuos en el inóculo ruminal de animales alimentados con rastrojo de rye-grass italiano y un concentrado comercial durante 21 días, la concentración de propionato se elevó y la del acetato disminuyó, sugiriendo que los cambios en las poblaciones microbianas permanecen por algún tiempo hasta retornar el equilibrio original.

Narvaez *et al.* (2013), observaron en un estudio *in vitro* una disminución significativa del número de metanógenos por efecto de la monensina en dosis de 5 a 10 µg/ml a comparación del control. Además, pudieron detectar que la monensina y la *Yucca schidigera* (650 µg) tienen un efecto aditivo sobre el número de metanógenos, reduciendo la cantidad de monensina (2.5 µg/ml) que se requiere para tener un efecto similar al que se logró cuando el sustrato se incubó solo con monensina en dosis de 5 o 10 µg/ml; los efectos en la reducción del número de copias de metanogénicos dependieron de la dosis de monensina, donde se observó la mayor disminución a una dosis de 5 y 10 µg comparado con el control sin monensina. Sin embargo, debe considerarse que en los sistemas *in vitro* las diferencias en el volumen podrían suponer que la dosis utilizada fuera superior comparada con la que se tendría *in vivo*.

Lo encontrado en el presente estudio está en concordancia con los estudios *in vivo* descritos anteriormente, por lo que probablemente a las dosis utilizadas *in vivo*, la monensina no afecta la densidad de las poblaciones de *archaeas* y su mecanismo de acción sobre la reducción de la producción de metano es indirecto, principalmente asociado con un incremento en la capacidad de las vías del acrilato o de descarboxilación del succinato para producir propionato derivado de la selección positiva de microorganismos gram negativos, e inhibición de otras poblaciones microbianas, principalmente gram positivos y protozoarios ciliados, productoras de H₂ en el rumen, por lo que el suministro de H₂ para la metanogénesis disminuye. El resultado final es un cambio en el patrón de los ácidos grasos volátiles, más propionato y menos acetato y butirato.

Efecto del procesamiento de los granos sobre la población de *archaeas* metanogénicas

En este estudio se esperaba diferencia en la densidad de las *archaeas* metanogénicas por efecto del procesamiento por cambios en el pH debidos a diferencia en la disponibilidad de almidón a nivel ruminal, ya que se sabe que las metanogénicas son sensibles a los pH bajos (Van Kessel y Russell, 1996). Aunque el pH no fue afectado estadísticamente por los dos diferentes procesos en ninguno de los tiempos de muestreo este disminuyó (< 6) en las primeras 8 horas posiblemente relacionado al establecimiento de la producción de AGV, pero no se detectaron cambios en la densidad de las poblaciones en comparación, justo antes de la alimentación donde el pH estuvo arriba de 6.

Adicionalmente, en otros trabajos donde se han evaluado otros factores como diferentes niveles de concentrado (Chong *et al.*, 2014), densidad energética de la dieta y consumo de alimento residual en ganado de carne (Zhou *et al.*, 2010), o la transición de una dieta 100 % forraje a una dieta alta en concentrado en ganado lechero (Hook *et al.*, 2011), se observó que el pH no disminuyó la densidad de las poblaciones de *archaeas* o la producción de CH₄ (Hünerberg *et al.*, 2015). Se ha observado que algunas especies pueden adaptarse y tolerar episodios de pH bajo mejor que otras, ya que la composición de la comunidad metanogénica juega un papel más importante que el número total de su población (Hünerberg *et al.*, 2015). Otro factor que puede influir en la sobrevivencia de los metanogénicos cuando disminuye mucho el pH es su resguardo en microambientes como biopelículas (Biofilms) o en el interior de los protozoarios que los protegerían de las fluctuaciones del pH (Hünerberg *et al.*, 2015).

Experimento 2 producción in vitro de gas y metano

Producción total de Gas

Los resultados de este estudio usando la técnica de Menke y Staingass mostraron que la monensina disminuyó la producción de gas (-27 ml /g MS; $p < 0.01$), pero la magnitud del efecto dependió del tipo de procesamiento del grano. Cuando se incluyó maíz molido y monensina, la magnitud de la reducción fue de -43.5 ml/ g MS, que cuando se incluyó grano rolado (-12 ml/ g MS), lo que indica que los factores tendieron a interactuar ($p < 0.07$). En contraste, con la técnica de ANKOM no se detectó que los factores interaccionaran sobre la producción total de gas (PTG; ml/ g MS/ 48h), pero la PTG de las dietas con grano rolado fue menor que la PTG con dietas que incluían grano molido ($P < 0.01$); por otra parte, la inclusión de monensina no afectó la PTG ($p < 0.18$). Esta diferencia podría radicar en la naturaleza de ambas técnicas, ya que en la técnica de ANKOM, los módulos liberan el gas producido constantemente, mientras que la técnica de Menke y Staingass es un sistema cerrado donde el gas se acumula conforme avanza la fermentación.

La combinación de humedad, calor (60 a 70 °C) y los rodillos (rolador) causa la gelatinización de los gránulos de almidón, que consiste en el hinchamiento de los gránulos por la absorción de agua lo cual rompe la estructura cristalina del almidón y la disolución de polisacáridos así como su difusión desde los gránulos (Safei y Yang, 2017). Estos cambios resultan en el incremento de la disponibilidad del almidón para las bacterias del rumen, así como más almidón es fermentado, se produce más gas, como un indicador de una mayor fermentación de la MO (Galyean *et al.*, 1976). Sin embargo, Lee *et al.* (2002) sugieren que los granos rolados deberán ser reducidos en el tamaño de su partícula, especialmente por la rumia, para que produzcan cantidades similares de gas que los granos molidos finamente. No obstante, aunque las muestras de alimento fueron molidas a través de una criba de 1mm, las dietas con el grano molido produjeron *in vitro* más gas que las dietas con el grano de rolado. En un estudio (Galyean *et al.*, 1976), los granos rolados produjeron casi la mitad que los granos hojueleados, lo cual fue atribuido a un mayor rompimiento de los gránulos de almidón indicando que el tamaño de partícula no influye mucho en la disponibilidad del almidón cuando los granos son procesados con vapor. Sin embargo, en un trabajo posterior, Galyean (1981) comparó maíz ensilado de alta humedad (HMC) con maíz molido (GC); encontró que la desaparición de la MS y del almidón fueron mayores cuando disminuyó el tamaño de partícula del maíz molido, lo que se traduciría en mayor

producción de gas. Gimeno *et al.* (2015) incubaron dietas con diferentes proporciones de grano de maíz y cebada (75:25 ó 25:75) y dos tipos de procesamiento molido o rolado en seco y, reportaron que hubo mayor producción de gas con el grano de maíz que el grano de cebada (287 vs 268 ml/g MO, respectivamente), pero los granos molidos y los rolados no mostraron diferencias estadísticas en la producción de gas total (278 vs 276 ml/g MO, respectivamente) o en la tasa de producción de gas (% h⁻¹), no obstante la diferencia en el tamaño de partícula. McAllister *et al.* (1993) indican que la matriz proteica puede ser un factor importante en la disponibilidad del almidón de los granos de maíz para microbios del rumen. Aunque el rolado podría destruir la matriz proteica del grano², este cambio no fue suficiente para producir una cantidad similar de gas al grano molido.

Por otro lado, el efecto de la monensina sobre la producción de gas ha sido más claro. García-González *et al.* (2010) estudiaron el efecto de inóculos provenientes de fermentadores RUSITEC tratados con monensina o extractos de plantas *Rheum spp* o *Frangula alnus* y diferentes tipos de sustrato (celulosa, almidón de maíz, rastrojo de cebada o una mezcla de forrajes y grano de cebada) sobre la producción de gas. Encontraron que en los sustratos ricos en celulosa (celulosa pura, rastrojo de cebada y la mezcla de forrajes) e incubados con inóculo proveniente de animales suplementados con el iónoforo, tanto la tasa fraccional como la producción de gas a las 24 horas disminuyeron. García-González *et al.* (2010) sugirieron que las bacterias celulolíticas pudieron ser afectadas por la monensina. En contraste, cuando el sustrato fue el almidón de maíz, la producción y la tasa fraccional de la producción de gas no fue afectada, sugiriendo que la actividad amilolítica no es afectada por el iónoforo.

Callaway y Martin (1996) estudiaron el uso de ácidos orgánicos y la monensina como medios para manipular la fermentación y reducir la producción de CH₄ en dietas con maíz quebrado y, aunque no probaron estadísticamente el efecto de la monensina sobre la producción de gas, la reducción fue consistente a través de diferentes pruebas con los ácidos orgánicos (92.7 vs 74.4 ml/24h). Se ha sugerido que el mecanismo de acción de la monensina puede estar relacionado a su efecto sobre bacterias celulolíticas u otro grupo de bacterias. Tomando en cuenta que los iónoforos no disminuyen significativamente la

² Comunicación personal Dr. Tom Tylutki, PhD, CEO AMTS LLC en el seminario "Advanced formulation and NDF explained"

actividad amilolítica (García-González et al. 2010), la causa de la tendencia de interacción en la producción de gas es incierta.

En el presente trabajo, el procesamiento y la monensina tendieron a interactuar ($p < 0.07$) en la tasa de producción de gas, ya que se observó un mayor incremento en dicha variable cuando se incluyó monensina en los tratamientos con grano rolado (6-02 vs 7.42 % h^{-1}). Esto indica que la respuesta del iónoforo es compleja y depende de la naturaleza de la dieta ya que se esperaba que el iónoforo disminuyera la tasa de producción de gas. Sin embargo, esta interacción también se observó en la proporción molar de propionato *in vivo*, por lo cual podría haber alguna relación.

Producción *in vitro* de metano

Efecto de la monensina sódica sobre la producción *in vitro* de metano

Uno de los principales efectos de la monensina en la fermentación es la redirección del exceso de flujo de electrones hacia la producción de propionato, lo que a su vez afecta la producción de CH_4 y acetato en el rumen porque se acorta la disponibilidad de H_2 para los microorganismos metanogénicos. No se ha determinado si la redirección de los electrones lejos de los metanogénicos pueda afectar la eficiencia con la que se degrada la MO en el rumen y su consecuencia en el consumo de MO digestible y, a su vez, en la productividad animal. De acuerdo con Schelling (1984) la monensina puede reducir la producción de CH_4 entre 4 al 31%. El presente estudio *in vitro*, confirmó que la inclusión de monensina redujo la producción de CH_4 en 9.4 ml/g MS, lo que significó una reducción del 18.5% de la producción total de CH_4 .

. García-González *et al.* (2010) reportaron que la inclusión de monensina en reactores Rusitec resultó en una mayor recuperación del porcentaje de recobre del hidrógeno en los ácidos grasos (85.5%), en comparación con extractos de plantas con diferentes substratos fibrosos.

Kim *et al.* (2014) condujeron un experimento *in vitro* para evaluar el efecto de la inclusión de monensina, el aceite de palma o el destilado de ácido láurico, variando dos tipos de substrato (heno de alfalfa o un concentrado basado en grano de maíz) sobre la producción total de metano y la proporción de metano en la muestra de gas. Reportaron que la monensina disminuyó significativamente la producción *in vitro* de CH_4 (-45%) y la proporción de CH_4 en la muestra (-55%), independientemente si el substrato era heno de

alfalfa o concentrado. En dicho estudio, la monensina alteró el patrón de la fermentación reduciendo el acetato y aumentando el propionato. Debido a que la monensina es lipofílica, un factor que puede alterar la respuesta a su inclusión en la dieta es la adición de aceite o grasa animal. Esto puede sugerir que es posible que se requieran mayores dosis de monensina, sin embargo, no se ha determinado a qué niveles de grasa o aceite podría ser evidente esta relación. No obstante, los incrementos de los niveles de inclusión del aceite de palma o del destilado de ácido láurico, el efecto de la monensina sobre la producción de CH₄ y el porcentaje en la muestra de gas de éste se mantuvo.

Narvaez *et al.*, (2013) argumentan que la monensina favorece la selección de bacterias gram negativas, ya que éstas en general son resistentes a la monensina (Russell y Houlihan, 2003). Cuando la metanogénesis es reducida y no hay otros aceptores de hidrógeno, éste se acumula en el rumen y se excreta vía eructo (Bauchop, 1967). Aunque esto significa un menor potencial de producción de CH₄, la eficiencia de la fermentación de la MO en el rumen podría ser afectada negativamente porque las metanogénicas podrían obtener menos energía libre durante la metanogénesis y los aceptores de electrones reductores podrían agotarse, afectando el metabolismo de las bacterias fermentativas (Wolin *et al.*, 1997; Ungerfeld y Kohn, 2006; Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

En general, estos resultados confirman que la naturaleza del sustrato o dieta afectan la respuesta microbiana a la inclusión de monensina y por lo tanto el patrón de fermentación.

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

Efecto de la inclusión de monensina sódica y el procesamiento del grano de maíz sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS).

. En este trabajo la digestibilidad de la MS no fue afectada por los tratamientos experimentales, aunque fue numéricamente superior en los tratamientos que contenían monensina. A este respecto, la respuesta de la digestibilidad a la inclusión de monensina no ha sido consistente. Por ejemplo, García-González *et al.* (2010) y Smith *et al.* (2010) no encontraron que la monensina afectara la DIVMS; mientras que Ponce *et al.* (2012), que midieron la digestibilidad en varios tiempos de incubación en presencia de diferentes ionóforos encontraron que la monensina incrementó la DIVMS a las 12 h de incubación, respecto al tratamiento control. Otra postura (Wallace *et al.*, 1980; Castro-Montoya *et al.*, 2012; Wischer *et al.*, 2013;) argumenta que la monensina disminuye la digestibilidad de la

MS, principalmente por afectar negativamente la digestión de la FDN y FDA, esto último como consecuencia de que el ionóforo afecta a las bacterias celulolíticas e inhibe la proteólisis y disminuye la disponibilidad de aminoácidos de cadena ramificada, los cuales son esenciales para las bacterias celulolíticas. Estos resultados indican que la respuesta a la inclusión de monensina podría estar relacionada al tipo de dieta.

Para efecto de este estudio, y aunque la técnica requiere uniformizar el tamaño de partícula del sustrato para la prueba de producción de gas y CH₄ se observaron diferencias en la producción total de gas que podrían haber estado asociadas a cambios en la digestibilidad *in vitro*. No obstante, no se detectó efecto del factor procesamiento. En concordancia con esta aseveración, Galyean (1981) comparó maíz ensilado de alta humedad (HMC) con maíz molido (GC); encontró que la desaparición de la MS y del almidón fueron mayores cuando disminuyó el tamaño de partícula del maíz molido.

Efecto de la inclusión de monensina y grano rolo en la estimación de la producción de metano de novillos alimentados con ensilado de maíz y concentrado.

Para realizar la estimación de las emisiones de CH₄ *in vivo* con base en los resultados de la prueba *in vitro*, se consideró el tipo de unidad experimental, el cual no fue ganado de tipo lechero; suministro de dietas experimentales similares a las que se utilizan en los sistemas intensivos de producción lechera, es decir con base en ensilado de maíz y concentrado. Por otro lado, las variables de fermentación ruminal que se midieron no requieren específicamente de ganado lechero y se puede considerar que pueden ser aplicables para ganado en lactación. Asimismo, se asumió que la producción de CH₄ entérico por unidad de MO consumida fue similar a la producción de CH₄ *in vitro*, ya que el consumo se fijó al 1.8% del peso vivo y su efecto en la digestibilidad ruminal podría ser mínimo. Se consideró que el contenido de energía bruta de las dietas es similar a 18.4 MJ/kg (Mc Donald *et al.*, 1995) y que el contenido de energía del CH₄ es de 55 MJ/kg.

De acuerdo con los datos de la estimación, la monensina redujo la producción de CH₄, lo que coincidió con el patrón de fermentación de la prueba *in vivo* de este experimento, donde quedó como evidencia que *in vivo* la proporción molar de propionato es mayor por el uso de monensina. Así mismo, la concentración de propionato en el rumen está correlacionada negativamente con la producción de CH₄ (Moss *et al.*, 2000). Considerando que no hubo efecto en la digestibilidad *in vitro* de las dietas, se puede sugerir que las poblaciones microbianas productoras de H₂ o la celulólisis no fueron afectadas o

que el redireccionamiento del H₂ no afectó la fermentación de la MO. En concordancia con esto, se ha observado que los animales recibiendo ionóforos eructan más H₂, sin afectar el consumo o la digestibilidad de la dieta (Spears, 1990). El efecto de la monensina sobre la producción de CH₄ y el patrón de fermentación del rumen ha sido consistente en estudios *in vitro* e *in vivo*. Thornton y Owens (1981) evaluaron el efecto de la inclusión de 200 mg de monensina en la producción *in vivo* de metano, la producción de AGV y la digestión de dietas con tres niveles de forrajes, cáscara de algodón y grano de maíz rolado ofrecidos a novillos en crecimiento y reportaron que la monensina redujo la producción de CH₄ entre 8 al 14%, como porcentaje de la energía bruta consumida. Independientemente del nivel de forraje de la dieta, la monensina decreció la concentración de acetato e incrementó la del propionato.

Sin embargo, en un estudio con novillos Holstein recibiendo dietas elaboradas a base de ensilaje de cebada y grano rolado con vapor y suplementados con monensina (33 mg / kg) y otros aditivos con mediciones de la producción *in vivo* de CH₄ en cámaras (McGinn *et al.*, 2004), la monensina redujo el acetato e incrementó el propionato, pero solo tendió ($p=0.09$) a reducir la producción de CH₄, medida como porcentaje de la energía bruta consumida (-9%). La digestibilidad de la dieta y de la fibra no fue afectada negativamente con la adición de la monensina, como lo han reportado otros autores (Thornton y Owens, 1981).

Con el consumo fijo y el valor energético de las dietas (18.4 MJ/kg), se pudo estimar que los animales consumieron en promedio 270 MJ de energía bruta. Asimismo, con los resultados *in vitro* de la producción de CH₄ y el consumo se pudo estimar que los tratamientos experimentales produjeron 35, 29.38, 33.12 y 27.5 moles de CH₄ para A, B, C y D respectivamente, y en términos de energía se perdieron en promedio 27.5 MJ de energía en forma de CH₄. Esta cantidad representa el 10.1 % del consumo total de energía bruta. Para considerar el volumen de CH₄ excretado por estos animales, se consideró que un mol de CH₄ es igual a 16 g y que un mol de cualquier gas en condiciones estándar ocupa 22.4 L y tiene una densidad de 0.73.

Sauer *et al.* (1998) hicieron una revisión de varios estudios y reportaron que hay mucha heterogeneidad en los valores de emisión de CH₄ entre estudios aun siendo el mismo tipo de ganado. Esta variación estaría asociada principalmente con las diferentes

técnicas de medición usadas para la determinación de CH₄ entérico y también a la heterogeneidad de las dietas y niveles de consumo entre diferentes estudios. Estos autores reportan que vacas Holstein maduras con peso de 600 kg produciendo 29±1.5 kg d⁻¹ de leche, pueden producir unos 622 L de CH₄ animal⁻¹ d⁻¹. De igual forma, tomando los datos de CH₄ en Mcal al día presentados por Moe y Tyrrel (1979), se estimó que las vacas lecheras en ese estudio produjeron desde 106.13 hasta 676 L de CH₄ con un promedio de 381.58 L y un consumo máximo de MS al día de 22.93 kg.

Castelán-Ortega *et al.* (2014) realizaron una estimación de la producción de CH₄ del ganado en México haciendo uso de diferentes modelos de predicción presentes en la literatura (Modelo de simulación integral). El resultado de su simulación arrojó que la producción de CH₄ para vacas lecheras en la región templada de México es de 283 g/d, con un consumo estimado de 11.3 Kg de MS. Así mismo, estimaron que la energía del metano tuvo un valor 3.73 Mcal (15.6 MJ) para vacas en la región templada del país y que la proporción de metano del consumo de energía bruta es 7.5 %. En el presente estudio el promedio de los 4 tratamientos fue 498 g/d pero con un consumo promedio de 14.8 Kg. El valor promedio de la proporción de metano en el presente estudio fue 9.09%. Este valor a pesar de ser superior al estimado por Castelán-Ortega *et al.*, (2014) todavía se encuentra en el intervalo propuesto por Johnson y Johnson (1995), el cual oscila entre el 2-12% de la energía bruta. La razón por la cual las emisiones estimadas son superiores sería el consumo de MS más elevado en comparación con el estimado por Castelán-Ortega *et al.*, (2014). Como porcentaje de la energía bruta Moe y Tyrrel (1979) reportan valores promedio de 6.31% con un rango desde 1.60 hasta 9.90%.

Por otro lado, los resultados de este estudio indican que los procesamientos que solo afectan el tamaño de partícula no tienen un efecto importante sobre la producción de metano en este tipo de dietas. Esto podría deberse al nivel de forraje, al porcentaje de inclusión de grano en la dieta, consumo o a otros factores dietéticos. A este respecto, algunos estudios han encontrado cambios en el patrón de fermentación y disminución de metano cuando se incluye maíz hojueado al vapor en dietas para ganado de carne (Zinn, 1987; Corona *et al.* 2006), el cual se conoce es un procesamiento que genera el efecto aditivo de la gelatinización de los granulos de almidón. Sin embargo, el patrón de fermentación observado *in vivo* en este estudio podría sugerir que el uso conjunto del maíz

rolado con monensina podría ser de valor para disminuir la emisión de metano. Para que este efecto sea confirmado se necesita medir la producción de metano *in vivo*.

Como conclusión, solo la monensina sódica fue capaz de disminuir la emisión de CH₄ estimada de los animales experimentales, esto como consecuencia del cambio en el patrón de fermentación y en las poblaciones de protozoarios.

CAPITULO VII CONCLUSIONES

El procesamiento del grano de maíz usado en el presente estudio no modifica por sí mismo la fermentación ruminal. Por otra parte, la monensina si alteró el patrón de fermentación incrementando la proporción de propionato y disminuyendo la de acetato. Esto podría ser explicado por cambios en las poblaciones de bacterias gram negativas productoras de propionato.

La síntesis de propionato es una ruta metabólica que compite por H⁺ contra la metanogénesis en el rumen, por lo que el aumento observado de la proporción de propionato cuando se incluyó monensina y grano rolado podría sugerir que su uso conjunto puede constituir una estrategia nutricional para disminuir las emisiones de metano. Sin embargo, para la confirmación de este efecto se necesita medir la producción de metano *in vivo*.

En concordancia con el patrón de fermentación *in vivo*, en la prueba *in vitro* la monensina fue eficaz para reducir la producción de gas y de metano. En contraste, el procesamiento molido generó mayor cantidad de gas en comparación con el maíz rolado a pesar de que por el requerimiento de la técnica las dietas fueron molidas al mismo tamaño de partícula; así mismo, la producción de metano no fue afectada por los procesamientos.

Los factores de estudio no tuvieron efecto las poblaciones de *archaeas* metanogénicas. Esto indica que la reducción de la producción *in vitro* de metano por efecto de la monensina no tiene relación directa con cambios en la abundancia de estas poblaciones.

Como se ha observado en otros estudios la monensina disminuyó el número de protozoarios por un efecto toxico directo. Así mismo, el rolado también redujo el número de protozoarios, lo cual podría estar relacionado con el bajo pH del líquido ruminal observado a las cuatro horas. Un menor número de protozoarios podría resultar en menor digestión de la fibra y en consecuencia menos producción de acetato. Este efecto explicaría en parte la disminución de la síntesis de metano debido a una menor disponibilidad de gas H⁺.

Abreviaturas y siglas usadas

Gigagramo.....	(Gg)
Dióxido de carbono	(CO ₂)
Metano	(CH ₄)
Oxido nitroso	(N ₂ O)
Gases de efecto invernadero	(GEI)
Materia orgánica	(MO)
Materia seca	(MS)
Hidrógeno	(H ₂)
Nitrógeno	(N)
Nitrógeno no proteico	(NNP)
Digestibilidad in vitro de la materia seca	(DIVMS)
Cinética de producción de gas	(CPG)
Producción total de gas	(PTG)
Consumo de materia seca	(CMS)
Concentración total de AGV	(AGVT)

CAPÍTULO VIII LITERATURA CITADA

- Abrar, A., Tsukahara, T., Kondo, M., Ban-Tokuda, T., Chao, W., and Matsui, H. (2015) 'Effect of monensin withdrawal on rumen fermentation, methanogenesis and microbial populations in cattle', *Animal Science Journal*, 86(9), pp. 849–854. doi: 10.1111/asj.12368.
- Abrar, A., Watanabe, H., Kitamura, T., Kondo, M., Ban-Tokuda, T., and Matsui, H. (2016) 'Diversity and fluctuation in ciliate protozoan population in the rumen of cattle', *Animal Science Journal*, 87(9), pp. 1188–1192. doi: 10.1111/asj.12591.
- Allen, M. S. and Piantoni, P. (2014) 'Carbohydrate Nutrition Managing Energy Intake Through Lactation', *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice*. Elsevier Inc, 30(3), pp. 577–597. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.07.004.
- AOAC. (1999) *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Edited by M. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg.
- Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, M. D. (2005) 'Nitrogen metabolism in the rumen', *J. Dairy Science*, 88((E. Suppl.)), pp. E9–E21.
- Baker, S. and Herrman, T. (1995) *Evaluating Particle Size, MF-2051 Feed manufacturing*. Kansas State university.
- Basurto G. R. (1995) 'Dinámica y Digestión ruminal de bovinos de carne alimentados con dietas a base de grano de maíz y pollinaza', pp. 1–75. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bauchop, T. (1967) 'Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues', *J Bacteriol.*, 94(1), pp. 171–175.
- 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(1–2), pp. 21–27. doi: 10.1071/EA07199.
- Beauchemin, K. A. and McGinn, S. M. (2005) 'Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets', *Journal of Animal Science*, 83(3), pp. 653–661. doi: /2005.833653x.
- Benchaar, C. (2015) 'Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin

- does not reduce enteric methane production of dairy cows', *Animal*, 10(3), pp. 418–425. doi: 10.1017/S175173111500230X.
- Bergen, W. G. and Bates, D. B. (1984) 'Ionophores: Their Effect on Production Efficiency and Mode of Action, *Journal of animal science*, 58, pp. 1465–1483.
- Bergen, W. G. and Yokoyama, M. T. (1977) 'Productive limits to rumen fermentation', *Journal of animal science*, 46(3), pp. 573–584.
- Bryant, M. P. (1979) 'Microbial Methane Production- Theoretical Aspects', *Journal of animal science*, 48(1), pp. 193–201.
- Callaway, T. R. and Martin, S. A. (1996) 'Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn', *Journal of Animal Science*, 74(8), pp. 1982–1989.
- Callison, S.L., Firkins, J.L., Eastridge, M.L. and Hull, B.L. (2001) 'Site of Nutrient Digestion by Dairy Cows Fed Corn of Different Particle Sizes or Steam-Rolled 1', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 84(6), pp. 1458–1467. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70179-8.
- Carere, C.R., Sparling, R., Cicek, N. and Levin, D.B. (2008) 'Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation', *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7), pp. 1342–1360. doi: 10.3390/ijms9071342.
- Castelán-Ortega, O. A., Ku-Vera, J. C. and Estrada-Flores, J. G. (2014) 'Modeling methane emissions and methane inventories for cattle production systems in Mexico', *Atmosfera*, 27(2), pp. 185–191. doi: 10.1016/S0187-6236(14)71109-9.
- Castro-Montoya, J. M., Makkar, H. P. S. and Becker, K. (2012) 'Effects of monensin on the chemical composition of the liquid associated microbial fraction in an in vitro rumen fermentation system', *Livestock Science*, 150(1–3), pp. 414–418. doi: 10.1016/j.livsci.2012.09.026.
- Chen, M. and Wolin, M. J. (1979) 'Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1), pp. 72–77.
- Chong, L., Zhuping, Z., Tongjun, G., Yongming, L. and Hongmin, D. (2014) 'Changes in methane emission, rumen fermentation, and methanogenic community in response to

- silage and dry cornstalk diets', *Journal of Basic Microbiology*, 54(6), pp. 521–530. doi: 10.1002/jobm.201200678.
- Church, D. C. (1988). *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. First edit. Edited by D.C. Church. Waveland Press inc. Available at: <http://www.amazon.com/Ruminant-Animal-Digestive-Physiology-Nutrition/dp/0881337404>.
- Clapeyron, F. (1834) 'Puissance motrice de la chaleur', *Journal de l'École polytechnique*, XIV, pp. 153–191. Available at: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k4336791/f157.table>.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H. and Cameron, M. R. (1992) 'Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows', *Journal of Dairy Science*, 75, pp. 2304–2323.
- Corona, L., Owens, F.N. and Zinn R.A. (2006) "Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle". *Journal of Animal Science*, 84, pp.3020–3031 doi:10.2527/jas.2005-603
- Costa, K. C. and Leigh, J. A. (2014) 'Metabolic versatility in methanogens', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 29(1), pp. 70–75. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.012.
- Dehority, B. A. (1984) 'Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa', *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), pp. 182–185.
- Dehority, B.A. (2005). "Ciliated Protozoa", In "Methods in gut microbial ecology for ruminants". Makkar, H.P.S. and Mc Sweeney, C.S (eds). pp. 67-78, IAEA, printed in Netherlands.
- Demeyer, D. I. and Van Nevel, C. J. (1979) 'Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms', *British Journal of Nutrition*, 42(3), pp. 515–524.
- Denman, S. E., Tomkins, N. W. and McSweeney, C. S. (2007) 'Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane', *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), pp. 313–322. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00394.x.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T. M. and Kenneth, J. (2010) 'Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification', *Journal of Immunological Methods*.

- Elsevier B.V., 354(1–2), pp. 34–39. doi: 10.1016/j.jim.2010.01.004.
- Eadie, J. (1959) 'Some aspects of rumen ciliate protozoa.', *Proceedings of the Nutrition Society*, 18(2), pp. 123–127. doi: 10.1079/PNS19590032.
- Ellis, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., Odongo, N.E., McBride, B.W. and France, J. (2008) 'Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle', *Journal of Agricultural Science*, 146, pp. 213–233. doi: 10.1017/s0021859608007752.
- Ellis, J.L., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., Hook, S.E., Archibeque, S. and France, J. (2012) 'Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle 1', *J Anim Sci.*, 90, pp. 2717–2726. doi: 10.2527/jas2011-3966.
- Ewing, D. L., Johnson, D. E. and Rumpler, W. V. (1986) 'Corn particle passage and size reduction in the rumen of beef steers', *Journal of animal science*, 63, pp. 1509–1515.
- FAO. (2006) *Livestock's Long Shadow. The Livestock, Environment and Development Initiative.* Edited by H. Steinfeld et al. Rome. Available at: <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM>.
- Fekedulegn, D., Mac Siurtain, M. P. and Colbert, J. J. (1999) 'Parameter Estimation of Nonlinear Growth Models in Forestry', *Silva Fennica*, 33(4), pp. 327–336.
- Firkins, J. L., Eastridge, M.L., St-Pierre, N.R. and Nofstger, S.M. (2001) 'Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle', *Journal of Animal Science*, 79(E-Suppl), pp. E218–E238. Available at: <http://jas.fass.org/content/79/E-Suppl/E218.short>.
- Fraga, D., Meulia, T. and Fenster, S. (2014) 'Real-Time PCR', *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 64(2), p. 10.3.1-10.3.40. doi: 10.1002/9780470089941.et1003s08.
- Franzolin, R. and Dehority, B. A. (1996) 'Effect of Prolonged High-Concentrate Feeding on Ruminal Protozoa Concentrations', *Journal of Animal Science*, (74), pp. 2803–2809. doi: /1996.74112803x.
- Galyean, M. L., Wagner, D. G. and Johnson, R. R. (1976) 'Site and Extent of Starch

- Digestion in Steers Fed Processed Corn Rations', *Journal of animal science*, 43(5), pp. 1088–1094.
- Galyean, M. L., Warner, D. G. and Owens, F.N. (1981) "Dry matter and starch disappearance of corn and sorghum as influenced by Particle size and processing". *Journal of dairy science*, 64 (9), pp.1804-1812.
- García-González, R., González, J. S. and López, S. (2010) 'Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum* spp.) and alder buckthorn (*Frangula alnus*)', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 93(8), pp. 3755–3763. doi: 10.3168/jds.2010-3107.
- Gimeno, A., Alami, A. Al., Abecia, L., de Vega, A., Fondevila, M. and Castrillo, C. (2015) 'Effect of type (barley vs. maize) and processing (grinding vs. dry rolling) of cereal on ruminal fermentation and microbiota of beef calves during the early fattening period', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 199, pp. 113–126. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.11.008.
- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H. and Krause, D.O. (2006) 'Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane', *Journal of Animal Science*, 84(7), pp. 1896–1906. doi: 10.2527/jas.2005-652.
- Habib, G. and Leng, R. A. (1986) 'Effect of monensin on ciliate protozoa in rumen of sheep fed an oaten chaff diet', *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 16, pp. 223–226.
- Hales, K. E., Cole, N. A. and Macdonald, J. C. (2012) 'Effects of corn processing method and dietary inclusion of wet distillers grains with solubles on energy metabolism, carbon – nitrogen balance, and methane emissions of cattle', *Journal of animal science*, 90, pp. 3174–3185. doi: 10.2527/jas2011-4441.
- Hall, M. B. (2014) 'Feed analyses and their Interpretation', *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice*. Elsevier Inc, 30(3), pp. 487–505. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.07.001.
- Hedderich, R. and Whitman, W. B. (2013) 'Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea', in *The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, pp. 635–662. doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_81.
- Hegarty, R. S. (1999) 'Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa', *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(8), p. 1321. doi:

10.1071/AR99008.

- Hegarty, R. S., Bird, S.H., Vanselow, B.A. and Woodgate, R. (2008) 'Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs', *British Journal of Nutrition*, 100, pp. 1220–1227. doi: 10.1017/S0007114508981435.
- Hook, S. E., Northwood, K.S., Wright, A.D.G. and 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), pp. 374–380. doi: 10.1128/AEM.01672-08.
- Hook, S. E., Steele, M.A., Northwood, K.S., Wright, A.D.G. and McBride, B.W. (2011) 'Impact of High-Concentrate Feeding and Low Ruminant pH on Methanogens and Protozoa in the Rumen of Dairy Cows', *Microbial Ecology*, 62(1), pp. 94–105. doi: 10.1007/s00248-011-9881-0.
- Hook, S. E., Wright, A.-D. G. and McBride, B. W. (2010) 'Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies', *Archaea*, 2010, pp. 1–11. doi: 10.1155/2010/945785.
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B. and 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), pp. 5045–5069. doi: 10.2527/jas2013-6583.
- Hünerberg, M., McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Entz, T., Okine, E.K., Harstad, O.M. and McAllister, T.A. (2015) 'Impact of ruminal pH on enteric methane emissions', *Journal of Animal Science*, 93(4), pp. 1760–1766. doi: 10.2527/jas2014-8469.
- Hungate, R. E. (1966) *The rumen and its microbes*. New York: Academy Press.
- IPCC. (2006) '2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme', in Eggleston, H. S. et al. (eds). Japan: IGES. Available at: http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4_Volume4/V4_10_Ch10_Livestock.pdf.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 2015. Primer Informe Bienal de Actualización ante

la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. INECC/Semarnat, México.

- Jalč, D., Baran, M., Vendrák, T. and Siroka, P. (1992) 'Effect of Monensin on Fermentation of Hay and Wheat Bran Investigated by the Rumen Simulation Technique (RUSITEC). Basal parameters of fermentation', *Archiv für Tierernaehrung*. Taylor & Francis Group, 42(2), pp. 147–152. doi: 10.1080/17450399209432984.
- Johnson, K. A. and Johnson, D. E. (1995) 'Methane emissions from cattle', *J Anim Sci*, 73, pp. 2483–2492. doi: /1995.7382483x.
- Kim, C. C. (2012) Identification of rumen methanogens, characterization of substrate requirements and measurement of hydrogen thresholds.
- Kim, M., Eastridge, M. L. and Yu, Z. (2014) 'Investigation of ruminal bacterial diversity in dairy cattle fed supplementary monensin alone and in combination with fat, using pyrosequencing analysis', *Can. J. Microbiol*, 60(October 2013), pp. 65–71. doi: dx.doi.org/10.1139/cjm-2013-0746.
- Knapp, J. R., Laur, G.L., Vadas, P. A., Weiss, W.P. and Tricarico, J.M. (2014) 'Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions.', *Journal of dairy science*. Elsevier, 97(6), pp. 3231–61. doi: 10.3168/jds.2013-7234.
- Knowlton, K. F., Allen, M. S. and Erickson, P. S. (1996) 'Lasalocid and particle size of corn grain for dairy cows in early lactation. 2. Effect on ruminal measurements and feeding behavior.', *Journal of dairy science*, 79(4), pp. 565–74. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76401-9.
- Knowlton, K. F., Glenn, B. P. and Erdman, R. A. (1998) 'Performance, Ruminal Fermentation, and Site of Starch Digestion in Early Lactation Cows Fed Corn Grain Harvested and Processed Differently', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 81(7), pp. 1972–1984. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75771-6.
- Krumholz, L. R., Forsberg, C. W. and Veira, D. M. (1983) 'Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa', *Can. J. Microbiol*, 29, pp. 676–680.
- Kumar, S., Puniya, A.K., Puniya, M., Dagar, S.S., Sirohi, S.K., Singh, K. and Griffith, G.W.(2009) 'Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies',

- World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(9), pp. 1557–1566. doi: 10.1007/s11274-009-0041-3.
- Lana, P. and Russell, J. B. (1997) 'Effect of Forage Quality and Monensin on the Ruminant Fermentation of Fistulated Cows Fed Continuously at a Constant Intake', *Journal of animal science*, 75, pp. 224–229.
- Lee, C., Lee, S., Shin, S.G. and Hwang, S. (2008) 'Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: Absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), pp. 371–376. doi: 10.1007/s00253-007-1300-6.
- Lee, S. Y., Kim, W.Y., Ko, J.Y. and Ha, J.K. (2002) 'Effects of Corn Processing on In Vitro and In Situ Digestion of Corn Grain in Holstein Steers', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(6), pp. 851–858. doi: 10.5713/ajas.2002.851.
- Leng, R. A. (1993) 'Quantitative ruminant nutrition — a green science', *Australian Journal of Agricultural Research*, 44, p. 363. doi: 10.1071/AR9930363.
- Leng, R. A. (1982) 'Modification of rumen fermentation', in Hacker, J. B. (ed.) *Nutritional limits to animal production from pastures. Proceeding. Commonwealth Agricultural Bureau. Farnham Royal.*, pp. 427–453.
- Lengowski, M. B., Zuber, K.H.R., Witzig, M., Möhring, J., Boguhn, J. and Rodehutschord, M. (2016) 'Changes in rumen microbial community composition during adaptation to an in vitro system and the impact of different forages', *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0150115.
- Lovett, D., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J. and 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), pp. 135–146. doi: 10.1016/j.livprodsci.2003.09.010.
- Maldonado Méndez, J. de J. and Garza Flores, J. de D. (1996) *Digestión ruminal de dietas con maíz o sorgo procesados, pollinaza y niveles crecientes de forraje en novillos brahman. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Martin, C., Morgavi, D. P. and Doreau, M. (2009) 'Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale', *animal*, 4(3), pp. 351–365. doi:

10.1017/S1751731109990620.

- Martinez-Fernandez, G., Denman, S.E., Yang, C., Cheung, J., Mitsumori, M. and McSweeney, C.S. (2016) 'Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle', *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.01122.
- Mathew, B., Eastridge, M.L., Oelker, E.R., Firkins, J.L. and Karnati, S.K.R. (2011) 'Interactions of monensin with dietary fat and carbohydrate components on ruminal fermentation and production responses by dairy cows.', *Journal of dairy science*. Elsevier, 94(1), pp. 396–409. doi: 10.3168/jds.2010-3580.
- Mc Donald, P., Edwards R.A., Greenhalgh, J.F.D. and Morgan, C.A. (1995) *Animal Nutrition*. fifth edit. Longman Scientific & Technical.
- McAllister, T. A., Phillippe, R.C., Rode, L.M. and Cheng, K.J. (1993) 'Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms', *Journal of animal science*, 71, pp. 205–212.
- McGinn, S. M., Beauchemin, K.A., Coates, T. and Colombatto, D. (2004) 'Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid.', *Journal of animal science*, 82(11), pp. 3346–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542482> (Accessed: 17 June 2017).
- Mendoza, G. D., Britton, R. A. and Stock, R. A. (1993) 'Influence of Ruminal Protozoa on Site and Extent of Starch Digestion and Ruminal Fermentation', *Journal of animal science*, 71, pp. 1572–1578.
- Menke, K. H. and Steingass, H (1988) 'Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid'.
- Mills, J. A. N., Crompton, L. A. and Reynolds, C. K. (2008) 'Ruminant Nutrition Regimes to reduce Methane and Nitrogen Emissions -A Meta-analysis of Current Databases'.
- Minson, D. J. (1993) 'Methane production by sheep and cattle in Australia', *Tellus*, pp. 86–88. doi: 10.1034/j.1600-0889.1993.00008.x.
- Moe, P. W. and Tyrrel, H. F. (1979) 'Methane production in dairy cows', *Journal of Dairy Science*, 62, p.1583. available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030279834657>.

- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C. and Newbold, C.J. (2010) 'Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants – CORRIGENDUM', *Animal*, 4(7), pp. 1024–1036. doi: 10.1017/S1751731112000407.
- Moss, A. R., Jouany, J.-P. and Newbold, J. (2000) 'Methane production by ruminants: its contribution to global warming (Review article)', *Annales de Zootechnie*, 49(3), pp. 231–253. doi: 10.1051/animres:2000119.
- Muntifering, R. B., Theurer, B., Swingle, R.S. and Hale, W.H. (1980) 'Effect of monensin on nitrogen utilization and digestibility of concentrate diets by steers.', *Journal of animal science*, 50(5), pp. 930–936.
- Nagaraja, T. G., Avery, T.B., Bartley, E.E., Galitzer, S.J. and Dayton, A.D. (1981) 'Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin', *Journal of Animal Science*, 53(1), pp. 206–216.
- Nagaraja, T. G., Newbold, C.J., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. (1997) 'Manipulation of rumen fermentation', in *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 523–632. Available at: http://books.google.com.my/books/about/The_Rumen_Microbial_Ecosystem.html?id=yPtaMQEACAAJ&pgis=1.
- Narvaez, N., Wang, Y. and Mcallister, T. (2013) 'Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), pp. 2517–2522. doi: 10.1002/jsfa.6068.
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E. and McEwan, N.R. (2015) 'The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen', *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.01313.
- Nguyen, S. H., Li, L. and Hegarty, R. S. (2016) 'Effects of Rumen Protozoa of Brahman Heifers and Nitrate on Fermentation and In vitro Methane Production', *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 29(6), pp. 807–813.
- Nozière, P., Glasser, F. and Sauvant, D. (2011) 'In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach', *animal*, 5(3), pp. 403–414. doi: 10.1017/S1751731110002016.

- Núñez, O.L. and Bouda J. (2007) *Patología clínica veterinaria*. Segunda ed. Edited by B. J. Núñez OL. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- Odongo, N. E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., Gray, J.T., Kebreab, E., France, J. and McBride, B.W. (2007) 'Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 90(4), pp. 1781–1788. doi: 10.3168/jds.2006-708.
- Orskov, E. R. (1986) 'Starch digestion and utilization in ruminants', *Journal of Animal Science*, 63, pp. 1624–1633.
- Owens, F. (2005) 'Corn grain processing and digestion', *Proc. Minn. Nutr. Conf.*, 66.
- Pérez-Barberia, F. J., Elston, D.A., Gordon, I.J. and Illius, A.W. (2004) 'The evolution of phylogenetic differences in the efficiency of digestion in ruminants', *Proc Biol Sci.*, 271(1543), pp. 1081–1090.
- Ponce, C. H., Smith, D.R., Branine, M.E., Hubbert, M.E. and Galyean, M.L. (2012) 'Effects of type of ionophore and carrier on in vitro ruminal dry matter disappearance, gas production, and fermentation end products of a concentrate substrate', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 171(2–4), pp. 223–229. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.11.003.
- Ranilla, M. J., Jouany, J. and Morgavi, D. P. (2007) 'Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro', *Letters in Applied Microbiology*, 45, pp. 675–680. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02251.x.
- Regensbogenowa, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon-Van Der Staay, S.Y., Van Der Staay, G.W.M., Hackstein, J.H.P., Newbold, C.J. and McEwan, N.R. (2004) 'Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE', *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), pp. 144–147. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01542.x.
- Rémond, D., Cabrera-Estrada, J.I., Champion, M., Chauveau, B., Coudure, R. and Poncet, C. (2004) 'Effect of Corn Particle Size on Site and Extent of Starch Digestion in Lactating Dairy Cows', *Journal of Dairy Science*, 87(5), pp. 1389–1399. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73288-9.
- Richards, C. J. and Hicks, B. (2007) 'Processing of Corn and Sorghum for Feedlot Cattle',

- Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, 23(2), pp. 207–221. doi: 10.1016/j.cvfa.2007.05.006.
- Steel, R.G. and Torrie, J.H. (1996) Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. Third edit.
- Roffler, R. E. and Satter, L. D. (1974) 'Relationship Between Ruminal Ammonia and Nonprotein Nitrogen Utilization by Ruminants. I. Development of a Model for Predicting Nonprotein Nitrogen Utilization by Cattle', Journal of dairy science, 58(12), pp. 1880–1888. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(75)84803-X.
- Russell, J. B. and Houlihan, A. J. (2003) 'Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health', FEMS Microbiology Reviews, 27(1), pp. 65–74. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00019-6.
- Russell, J. B. and Strobel, H. J. (1988) 'Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic.', Journal of animal science, 66(2), pp. 552–558.
- Russell, J. B. and Strobel, H. J. (1989) 'Effect of ionophores on ruminal fermentation.', Applied and Environmental Microbiology, 55(1), pp. 1–6.
- Safei, K. and Yang, W. Z. (2017) 'Effects of Grain Processing with Focus on Grinding and Steam- Flaking on Dairy Cow Performance', in Vonnice, S. (ed.) Herbivores. Intech, pp. 117–131. doi: 10.5772/67344.
- Saro Higuera, C., Ranilla García, M. J. and Carro Travieso, M. D. (2012) Estructura de las comunidades microbianas ruminales de ovejas alimentadas con diferentes dietas. Available at: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/exttes?codigo=27207%5Cnhttp://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=27207&orden=405241&info=link>.
- Satter, L. D. and Slyter, L. (1974) 'Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro', British Journal of Nutrition, 32, pp. 199–208.
- Sauer, F. D., Fellner, V., Kinsman, R., Kramer, J.K.G., Jackson, H.A., Lee, A.J. and Chen, S. (1998) 'Methane Output and Lactation Response in Holstein Cattle with Monensin or Unsaturated Fat Added to the Diet', Journal of Animal Science, 76(3), pp. 906–914.

- Schelling, G. T. (1984) 'Monensin mode of action in the rumen.', *Journal of animal science*, pp. 1518–1527. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Sejian, V., Gaughan, J., Baumgard, L. and Prasad, C. (2015) *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*. Edited by V. Sejian et al. New Delhi: Springer India. doi: 10.1007/978-81-322-2265-1.
- Shell, L. A., Hale, W.H., Theurer, B. and Swingle, R.S. (1983) 'Effect of Monensin on Total Volatile Fatty Acid Production by Steers Fed a High Grain Diet', *Journal of Animal Science*, 57(1), pp. 178–185.
- Shibata, M. and Terada, F. (2010) 'Factors affecting methane production and mitigation in ruminants', *Animal Science Journal*, 81(November 2008), pp. 2–10. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00687.x.
- Sirohi, S. K., Pandey, N., Singh, B. and Puniya, A.K. (2010) 'Rumen methanogens: A review', *Indian Journal of Microbiology*, 50(3), pp. 253–262. doi: 10.1007/s12088-010-0061-6.
- Smith, D. R., DiLorenzo, N., Leibovich, J., May, M.L., Quinn, M.J., Homm, J.W. and Galyean, M.L. (2010) 'Effects of sulfur and monensin concentrations on in vitro dry matter disappearance, hydrogen sulfide production, and volatile fatty acid concentrations in batch culture ruminal fermentations', *Journal of Animal Science*, 88(4), pp. 1503–1512. doi: 10.2527/jas.2009-2498.
- Spears, J. W. (1990) 'Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants', *J Nutr.*, 120, pp. 632–638.
- Stevens, C. E. and Hume, I.D. (1998) 'Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients', *Physiological reviews*, 78(2), pp. 393–427.
- Subcommittee on Nitrogen Usage in Ruminants, Committee on Animal Nutrition, NRC. (1985) *Ruminant nitrogen usage*. First edit. Washington, D.C: National Academic Press. Available at: <https://www.nap.edu/catalog/615/ruminant-nitrogen-usage>.
- Surber, L. M. M. and Bowman, J. G. P. (1998) 'Monensin Effects on Digestion of Corn or Barley High-Concentrate Diets 1', *Journal of animal science*, (76), pp. 1945–1954.

- Tejada de Hernandez, I. (1992) Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Segunda ed. Edited by I. Tejada de Hernández. Sistema de educación continua en producción animal, A.C.
- Thauer, R. K., Kaster, A., Seedorf, H., Buckel, W. and Hedderich, R. (2008) 'Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation', *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), pp. 579–591. doi: 10.1038/nrmicro1931.
- Theurer, C. B., Huber, J.T., Delgado-Elorduy, A. and Wanderley, R. (1999) 'Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows.', *Journal of dairy science*. Elsevier, 82(9), pp. 1950–1959. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75431-7.
- Thornton, J. H. and Owens, F. N. (1981) 'Monensin supplementation and in vivo methane production by steers.', *Journal of animal science*, 52(3), pp. 628–634.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K. and Kojima, Y. (1997) 'Methanogens associated with rumen ciliates', *FEMS Microbiology Ecology*, 22(2), pp. 137–143. doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00365.x.
- Ungerfeld, E. M. and Kohn, R. A. (2006) 'The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation', in Sejrsen, K., Hvelplund, T., and Nielsen, M. O. (eds) *Ruminant Physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers, pp. 55–85.
- Ushida, K. (2010) 'Symbiotic Methanogens and Rumen Ciliates', in (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea, pp. 1–235.
- Van Kessel, J. A. S. and Russell, J. B. (1996) 'The effect of pH on ruminal methanogenesis', *FEMS Microbiology Ecology*, 20(4), pp. 205–210. doi: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00319.x.
- Van Nevel, C. J. and Demeyer, D. I. (1977) 'Effect of monensin on rumen metabolism in vitro', *Applied and Environmental Microbiology*, 34(3), pp. 251–257.
- Van Soest, P. J. (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Second Edi. Ithaca Estados Unidos: Cornell University Press.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. (1991). 'Methods for Dietary Fiber,

- Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 74(10), pp. 3583–3597. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- Veira, D. M. (1986) 'The role of ciliated Protozoa in Nutrition of the Ruminant', *Journal of animal science*, 63, pp. 1547–1560.
- Vignais, P. M., Billoud, B. and Meyer, J. (2001) 'Classification and phylogeny of hydrogenases 1', *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press, pp. 455–501. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00587.x.
- Wallace, R. J., Cheng, K. J. and Czerkawski, J. W. (1980) 'Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen', *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3), pp. 672–674.
- Wallace, R. J., Czerkawski, J. W. and Breckenridge, G. (1981) 'Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the Rumen Simulation Technique (Rusitec)', *British Journal of Nutrition*, 46(1), p. 131. doi: 10.1079/BJN19810016.
- Weimer, P. J. (1996) 'Why Don't Ruminal Bacteria Digest Cellulose Faster?', *Journal of dairy science*, 79, pp. 1496–1502.
- Weimer, P. J. (1998) 'Manipulating Ruminal Fermentation: A Microbial Ecological Perspective 1', *Journal of Animal Science*, 76(12), pp. 3114–3122. doi: 10.1016/j.athoracsur.2007.03.023.
- Weimer, P. J., Stevenson, D.M., Mertens, D.R. and Thomas, E.E. (2008) 'Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), pp. 135–145. doi: 10.1007/s00253-008-1528-9.
- Wischer, G., Boguhn, J., Steingass, H., Schollenberger, M., Hartung, K. and Rodehutschord, M. (2013) 'Effect of monensin on in vitro fermentation of silages and microbial protein synthesis', *Archives of Animal Nutrition*, 67(3), pp. 219–234. doi: 10.1080/1745039X.2013.793050.
- Wolin, M. J. (1960) 'A Theoretical Rumen Fermentation Balance', *Journal Of Dairy Science*. Elsevier, 43(10), pp. 1452–1459. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(60)90348-9.

- Wolin, M. J., Miller, T. L. and Stewart, C. S. (1997) 'Microbe-microbe interactions', in Hobson, P. N. and Stewart, C. S. (eds) *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, pp. 467–491.
- Wünschiers, R., Jahn, M., Jahn, D., Schomburg, I., Peifer, S., Heinzle, E., Burtscher, H., Garbe, J., Steen, A., Schobert, M., Oesterhelt, D., Wachtveitl, J. and Chang, A. (2013) 'Metabolism', in *Biochemical Pathways*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 37–209. doi: 10.1002/9781118657072.ch3.
- Yang, C. M. and Russell, J. B. (1993) 'The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria.', *Journal of animal science*, 71(12), pp. 3470–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294302>.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K.A., Koenig, K.M. and Rode, L.M. (1997) 'Comparison of Hull-less Barley, Barley, or Corn for Lactating Cows: Effects on Extent of Digestion and Milk Production', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 80(10), pp. 2475–2486. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76200-3.
- Yang, W. Z., Oba, M. and McAllister, T. A. (2012) 'Quality and precision processing of barley grain affected intake and digestibility of dry matter in feedlot steers', *Canadian Journal of Animal Science*, 93(2), pp. 251–260. doi: 10.4141/cjas2012-132.
- Yu, Z. and Morrison, M. (2004) 'Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples', *BioTechniques*, 36(5), pp. 808–812. doi: 10.2144/3605A0808.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Luo Guan, L. and 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), pp. 3776–3786. doi: 10.1128/AEM.00010-10.
- Zhou, M., McAllister, T. A. and Guan, L. L. (2011) 'Molecular identification of rumen methanogens: Technologies, advances and prospects', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 166–167, pp. 76–86. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.04.005.

- Zinn, R. A., Barreras, A., Corona, L., Owens, F.N. and Plascencia, A. (2011) 'Comparative effects of processing methods on the feeding value of maize in feedlot cattle.', *Nutrition research reviews*, 24(2), pp. 183–90. doi: 10.1017/S0954422411000096.
- Zinn, R. A. (1987) 'Influence of lasalocid and monensin plus tylosin on comparative feeding value of steam-flaked versus dry-rolled corn in diets for feedlot cattle.', *Journal of animal science*, 65(1), pp. 256–266.
- Zinn, R. A., Plascencial, A. and Barajas, R. (1994) 'Interaction of Forage Level and Monensin in Diets for Feedlot Cattle on Growth Performance and Digestive Function', *Journal of animal science*, 72, pp. 2209–2215.

ANEXOS

Anexo 1 programa para ajustar el modelo no lineal (monomolecular) a los datos de producción de gas.

```
DATA PG;
INPUT REP TP PG @@;
CARDS;

;
RUN;

PROC SORT DATA=PG;
BY REP TP;
RUN;

PROC NLIN DATA=PG BEST=100 MAXITER=50 G4SINGULAR METHOD=MARQUARDT
OUTEST=EST ; OUTPUT OUT=results1 P=predy R=resid; BY REP;

TITLE 'MODELO MONOMOLECULAR';

PARAMETERS
B1 = 200 240
DELTA = .05 0.10 0.15 0.20;

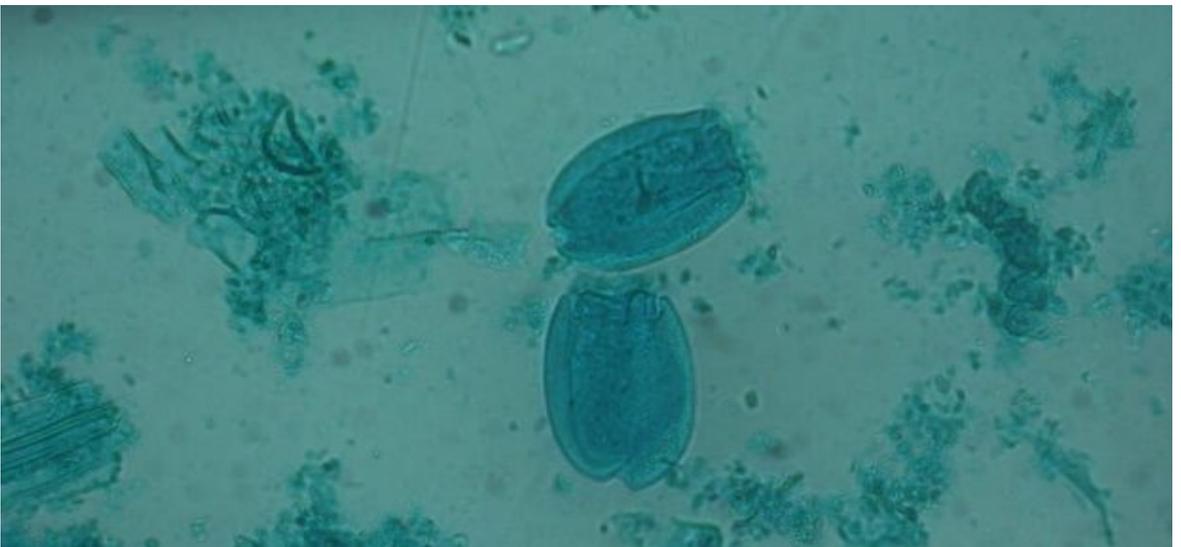
E1=EXP(-(DELTA*TP));
model PG= B1*(1-(E1));
output out=nlinout1 predicted=pred l95M=l95mean u95M=u95mean
l95=l95ind u95=u95ind Residual=RESID STDR=STDR STDP=STDP STDI=STDI;
run;

proc plot DATA=NLINOUT1; BY REP;
plot PRED*tp='*' /overlay vzero HZERO vpos=30 hpos=50;
plot RESID*PRED='*' /overlay vzero HZERO vpos=40 hpos=50;
run;
```

Anexo 2. Fotografías de protozoarios ciliados con la tinción de verde brillante



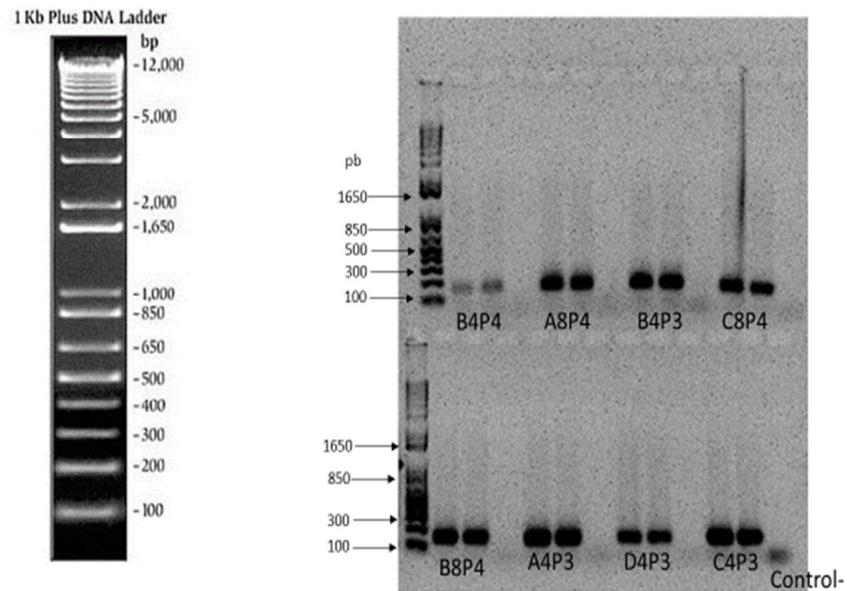
Foto 100x de protozooario ciliado del género *Entodinium*.



Fotografía 40x de protozoarios ciliados, probablemente de la subfamilia *Diplodiniinae*.

Para hacer la identificación a nivel de género se necesita aumento 450x y tinciones diferenciales como azul de metileno o lugol (Dehority, 2005).

Anexo 3 Fotografía de gel producto de reacción de qPCR.



La fotografía muestra la imagen en negativo de un gel representativo donde puede verse el producto amplificado de 160 pb en muestras problema de contenido ruminal por medio de PCR en tiempo real. El fragmento amplificado corresponde a la secuencia del gen *mcrA* que codifica la *metil coM reductasa*, enzima que cataliza la reacción final de la metanogénesis.

