



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR METANO EN EL RUMEN Y SU RELACIÓN CON EL MICROBIOMA RUMINAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

JONATHAN NOÉ AVILÉS NIETO

TUTOR PRINCIPAL

LUIS CORONA GOCHI

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTORAL

JUAN HEBERTH HERNÁNDEZ MEDRANO

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, UNIVERSITY OF CALGARY

JACINTO EFRÉN RAMÍREZ BRIBIESCA

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, CAMPUS MONTECILLO.

Ciudad de México

Abril de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Resumen.

Entre las estrategias nutricionales para disminuir la emisión de metano, la adición de grasas ha mostrado ser efectiva y práctica, sin embargo, determinar el nivel óptimo de grasa en la dieta, para aumentar el aporte energético y reducir las emisiones de metano (CH₄). Se realizó un experimento con cuatro vacas canuladas en el rumen (*Bos taurus* × *Bos indicus*, 657 ± 92 kg de peso vivo, PV) en un sistema de pastoreo rotacional (*Urochloa* sp.), asignadas a uno de cuatro niveles de inclusión de aceite de canola (AC), 0.0, 0.40, 0.80 y 1.2 g/kg de peso vivo mermado (PVM, PV ajustado para descontar el llenado gastrointestinal, PV*0.96) en un diseño de Cuadrado Latino 4×4 para evaluar las emisiones de CH₄, consumo y digestibilidad de la dieta. Las emisiones de CH₄ se estimaron utilizando una metodología de un analizador de infrarrojos (método *Sniffer*). El consumo de pasto y la producción fecal se estimaron utilizando óxido de cromo (Cr₂O₃) como marcador externo. La adición de AC aumentó linealmente (P < 0.05) el consumo total de materia seca (CMS) y energía bruta, con una tendencia de aumento lineal (P = 0.09) en el consumo de fibra detergente neutra (FDN). La energía digestible (Mcal/kg) aumentó linealmente (P < 0.05) con la adición de AC, la digestión de la MS, MO, FDN y PB no se observaron diferencias. La adición máxima de AC (1.2 g/kg PVM) disminuyó (P < 0.05) la población total de protozoos ruminales, la relación acetato:propionato y la producción de CH₄ entérico (g/kg CMS) en un 9.1, 5.3 y 17.5 %, respectivamente. Los grupos taxonómicos bacterianos a nivel de filo más abundantes fueron *Firmicutes* (54.6 %), *Bacteroidetes* (34.8 %) y *Protobacterias* (5.4 %). Los filos *Euryarchaeota* y *Firmicutes* disminuyeron en los tratamientos con adición de 0.4 y 0.8 g/kg PVM, en cambio, la familia *Succinivibrionacea* y el género *Succinivibrio* incrementaron su abundancia, con relación al tratamiento sin AC, en los mismos tratamientos. Se demostró que, la inclusión de hasta 1.2 g/kg PVM, equivalente a 5.8 % de la dieta total, para vacas pastando forrajes tropicales, no afecta negativamente el consumo y la digestión de nutrientes, en tanto que, reduce la eficiencia de la fermentación ruminal y la emisión de CH₄ entérico (≤ 17.5 %).

Palabras clave: metano, aceite de canola, bovinos, pastoreo, digestión.

Abstract.

Among the nutritional strategies to reduce methane emissions, the addition of fats has shown to be effective and practical, however, determining the optimal level of fat in the diet to increase energy intake and reduce methane (CH₄) emissions. An experiment was conducted with four rumen-cannulated cows (*Bos taurus* × *Bos indicus*, 657 ± 92 kg body weight, BW) in a rotational grazing system (*Urochloa* sp.), assigned to one of four inclusion levels of canola oil (CO), 0.0, 0.40, 0.80 and 1.2 g/kg shrunk body weight (SBW, BW adjusted for gastrointestinal filling, PV*0.96) in a 4×4 Latin Square design to evaluate CH₄ emissions, intake and digestibility of the diet. Methane emissions were estimated using an infrared analyser methodology (*Sniffer* method). Pasture intake and faecal production were estimated using Cr₂O₃ as an external marker. The addition of CO increased linearly (P ≤ 0.05) total dry matter and gross energy intake, with a linear increase trend (P = 0.09) in neutral detergent fibre (NDF) intake. Digestible energy (Mcal/kg) increased linearly (P < 0.05) with the addition of CO, the digestion of DM, OM, NDF and CP did not observe differences. Maximum addition of CO (1.2 g/kg SBW) decreased (P < 0.05) the total population of ruminal protozoa, the acetate:propionate ratio, and enteric CH₄ production (g/kg DMI) by 9.1, 5.3, and 17.5 %, respectively. Most abundant bacterial taxonomic groups at the phylum level were *Firmicutes* (54.6 %), *Bacteroidetes* (34.8 %) and *Protobacterias* (5.4 %). The most abundant taxonomic groups at phylum level were *Firmicutes* (54.6 %), *Bacteroidetes* (34.8) and *Protobacterias* (5.4 %), *Euryarchaeota* and *Firmicutes* decreased in treatments with CO supplementation 0.4 and 0.8 g/kg SBW. On the other hand, *Succinivibrionacea* family and *Succinivibrio* genus increased their abundance, in relation to the treatment, in the same treatments. This study showed that the inclusion of up to 1.2 g/kg SBW, equivalent to 5.8 % of the total diet, for cows grazing tropical forages, does not negatively affect the intake and digestion of nutrients, while it reduces the efficiency of rumen fermentation and the emission of enteric CH₄ (≤ 17.5 %).

Keywords: Methane, Canola oil, Cattle, Grazing, Digestion.

Contenido

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1	Emisiones de Gases Efecto Invernadero	4
2.2	Metanogénesis ruminal.....	5
2.3	Biotecnología aplicada al estudio del microbioma ruminal	7
2.4	Técnicas utilizadas para medir metano en los animales	8
2.4.1	Cámaras respiratorias.....	8
2.4.2	Trazador, hexafluoruro de azufre (SF ₆).....	9
2.4.3	Sistema Greenfeed	10
2.4.4	Sensores infrarrojos	11
2.5	Estrategias de mitigación de metano	12
2.5.1	Selección genética.....	12
2.5.2	Manipulación ruminal.....	14
2.5.3	Vacuna contra metanógenos	20
2.5.4	Manipulación de la dieta	20
3	JUSTIFICACIÓN	25
4	HIPÓTESIS	26
5	OBJETIVOS	27
6	MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1	Localización.....	28
6.2	Animales, alimentación y diseño experimental.....	28
6.3	Muestreo	29
6.4	Estimación de emisiones de metano	30
6.5	Análisis de muestras	32
6.6	Extracción de ADN	33
6.7	Perfil de microbiota ruminal.....	34
6.8	Análisis bioinformático de microbiota ruminal.....	35
6.9	Análisis estadístico	36
7	RESULTADOS	37
7.1	Alimento utilizado durante el experimento	37
7.2	Consumo de materia seca y digestibilidad.	37
7.3	Fermentación ruminal.....	38
7.4	Emisiones de metano	39
7.5	Caracterización de la población ruminal microbiana	40
7.5.1	Población de protozoos	40

7.5.2	Resumen de datos de secuencia de ADN.....	40
7.5.3	Análisis de diversidad alfa	40
7.5.4	Análisis de diversidad beta	41
7.5.5	Asignaciones taxonómicas.....	42
8	DISCUSIÓN	49
8.1	Consumo y digestibilidad	49
8.2	Fermentación ruminal.....	50
8.3	Emisiones de metano	51
8.4	Caracterización de la población ruminal microbiana	53
9	CONCLUSIONES.....	56
10	REFERENCIAS.....	57
11	ARTÍCULO PUBLICADO	74

Lista de cuadros.

Cuadro 1. Composición de ácidos grasos (en g/100 g del total de ácidos grasos) de aceites de semillas oleaginosas.	22
Cuadro 2. Composición química de los ingredientes utilizados durante el experimento.	37
Cuadro 3. Consumo de materia seca, excreción fecal y digestión total del tracto de vacas alimentadas con diferentes niveles de aceite de canola.....	38
Cuadro 4. Efecto de la inclusión de aceite de canola sobre el nitrógeno amoniacal del líquido ruminal, el pH, los ácidos grasos volátiles y el metano.	39
Cuadro 5. Efecto de la inclusión de aceite de canola sobre concentración protozoos.	40
Cuadro 6. Abundancia relativa (%) de los principales filos bacterianos en vacas suplementadas con aceite de canola (0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM).	42
Cuadro 7. Abundancia relativa (%) de las principales familias bacterianas en vacas suplementadas con aceite de canola (0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM).	45
Cuadro 8. Abundancia relativa (%) de los principales géneros bacterianos en vacas suplementadas con aceite de canola (0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM).	47

Lista de figuras.

Figura 1. Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero (INECC, 2018).	4
Figura 2. Esquema de la fermentación microbiana y las vías de reducción del H ₂ en el rumen (modificado de Morgavi <i>et al.</i> , 2010).....	5
Figura 3. Estrategias de mitigación de CH ₄ entérico y sus derivados, adaptado de de Souza <i>et al.</i> (2021).	12
Figura 4. Diferencia en alfa diversidad con la inclusión de aceite de canola usando el (A) índice Shannon y (B) índice Chao1.	41
Figura 5. Diferencia en beta diversidad con el análisis UniFrac ponderado (A) y no ponderado (B) con la inclusión de aceite de canola.	41
Figura 6. Diferencia en la composición de bacterias con la inclusión de aceite de canola a nivel de filo. (A) Análisis de componentes principales (ACP); (B) Abundancia relativa (%) de bacterias.	42
Figura 7. Diferencia en la composición de bacterias con la inclusión de aceite de canola a nivel de familia. (A) Análisis de componentes principales (ACP); (B) Abundancia relativa (%) de bacterias. canola.....	44
Figura 8. Diferencia en la composición de bacterias con la inclusión de aceite de canola a nivel de género. (A) Análisis de componentes principales (ACP); (B) Abundancia relativa (%) de bacterias.	46

1 INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de CO₂ han aumentado el 50%, desde la edad preindustrial, mientras que las emisiones de CH₄ han aumentado en aproximadamente 150%, debido al uso creciente de combustibles fósiles, pero también debido al aumento de rumiantes, vertederos y campos de arroz que corresponde al aumento de la población humana (Ghosh *et al.*, 2015). Por lo que, el aumento en las concentraciones absolutas desde mediados del siglo XX y el forzamiento radiativo (el forzamiento radiativo es la medida de la influencia que tiene un factor para modificar el equilibrio de la energía entrante y saliente en el sistema atmosférico de la Tierra y representa un índice de la importancia del factor como mecanismo potencial del cambio climático, IPCC, 2013) asociado con este gas justifican el papel prominente que el CH₄ ha tenido en las discusiones sobre el calentamiento global (Ruppel y Kessler, 2017).

En México, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021), las cifras preliminares para la población de bovinos productores de carne y leche es de 35 998 885 cabezas, siendo el estado de Veracruz el que alberga mayor número de animales (4 549 067) seguido por Jalisco (3 430 721), Chiapas (2 627 827) y Chihuahua (2 541 241), lo que indica que tan solo el estado de Veracruz y Chiapas albergan casi el 20 % de cabezas de ganado en sistemas de pastoreo tropical. Por lo que un impacto en la reducción de emisiones de CH₄ en sistemas de producción en pastoreo bajo condiciones tropicales podría ser potencialmente significativo.

Estos sistemas de pastoreo en trópico por lo regular utilizan especies de forrajes con una baja calidad nutricional, por lo que, se requiere alguna estrategia nutricional que disminuya las emisiones de CH₄ y aumente la densidad de nutrientes a la dieta. La complementación con alimentos concentrados y adición de aceites vegetales, podría ser una buena opción, aunque existe poca información al respecto. Por lo anterior el objetivo del presente estudio es encontrar el nivel óptimo de adición de AC en vacas F1 (*Bos Taurus* × *Bos indicus*) mantenidas en pastoreo y recibiendo una cantidad fija de concentrado.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Emisiones de Gases Efecto Invernadero

Uno de los principales objetivos en los diversos sistemas de producción de rumiantes a nivel mundial es mejorar la eficiencia productiva, así como reducir la producción de Gases de Efecto Invernadero (GEI), que para la producción ganadera son el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) (Moss *et al.*, 2000; Steinfeld *et al.*, 2006).

A medida que aumentan las pruebas para evaluar el calentamiento atmosférico por periodos sostenidos durante la última mitad del siglo XX y el comienzo del siglo XXI, se ha generado una mayor conciencia del impacto del CH₄ para el calentamiento global por su efecto invernadero (Ruppel y Kessler, 2017).

La concentración absoluta de CO₂ en la atmosfera fue de aproximadamente 400 ppm, mientras que las emisiones de CH₄ fue de superior a 1.8 ppm, las concentraciones de N₂O estuvieron ligeramente arriba de 320 ppm para 2011 (IPCC, 2013; Carpenter *et al.*, 2014) sin embargo, el forzamiento radiativo del CH₄ y del N₂O tienen un mayor impacto sobre el calentamiento global (Solomon *et al.*, 2007).

El CO₂ (GEI más abundante) es el principal contribuyente antropogénico al forzamiento radiativo (Cristofanelli *et al.*, 2018). Además, es la base para medir el potencial de calentamiento global (PCG, cantidad de energía que absorberán las emisiones de una tonelada de un gas en un período de tiempo determinado, en relación con las emisiones de una tonelada de CO₂; IPCC, 2013). El PCG en horizonte de 100 años (PCG¹⁰⁰) del CH₄ es de 28 (34 con retroalimentación carbono-clima) con una vida media ligeramente por superior a 12 años, mientras que el PCG¹⁰⁰ del N₂O es de 265 con una vida media de 114 años (Solomon *et al.* 2007; IPCC, 2013; Collins *et al.*, 2013).

El CH₄ liberado en la troposfera, reacciona (oxidación) con el radical hidroxilo (OH⁻), lo que conduce a la formación de formaldehído (CH₂O: 90%), monóxido de carbono (CO) y (con los óxidos de nitrógeno (NO_x) suficientes) ozono (O₃, Lelieveld *et al.*, 2008). Ya en la estratosfera, la oxidación de CH₄ promueve la formación de vapor de agua y, por lo tanto, un mayor forzamiento radiativo, se ha estimado que el 25% del aumento en el vapor de agua estratosférico observado

entre 1980 y 2010 se debió a una mayor concentración de CH₄ (Hurst *et al.*, 2011). Por lo que esfuerzos internacionales han sido necesarios, a continuación, se describen algunos de ellos.

El Protocolo de Kyoto (1998-2012) es un acuerdo internacional vinculado a Convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático, que compromete a sus partes al establecer objetivos de reducción de emisiones vinculantes para seis GEI (CO₂, CH₄, N₂O, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos y el hexafluoruro de azufre), cada gas ponderado por su PCG¹⁰⁰ y agregado para dar emisiones totales de GEI en equivalentes de CO₂, durante el primer período de compromiso, 37 países industrializados y la Comunidad Europea se comprometieron a reducir las emisiones de GEI a una media del 5% con respecto a los niveles de 1990 (Breidenich *et al.*, 1998; Diniz, 2007; Peters y Hertwich, 2008).

En Doha (Qatar), en diciembre de 2012, se adoptó una enmienda que acordó asumir compromisos de disminución de GEI en un segundo período del 1 de enero de 2013 al 31 de diciembre de 2020. Durante el segundo período de compromiso, las Partes acordaron reducir las emisiones de GEI al menos un 18% por debajo de los niveles de 1990 en un período de 8 años desde 2013 hasta 2020 (Štreimikienė, 2013).

Posteriormente, en noviembre de 2016, cuando entró en vigor el Acuerdo de París, se difundió a todas las naciones a una causa común para emprender esfuerzos ambiciosos para combatir el cambio climático y adaptarse a sus efectos, con un mayor apoyo para ayudar a los países en desarrollo a hacerlo. El objetivo fue fortalecer la respuesta global a la amenaza del cambio climático manteniendo un aumento de la temperatura global, en este siglo muy por debajo de 2° C por encima de los niveles preindustriales y continuar los esfuerzos para limitar el aumento de la temperatura por más de 1.5° C.

En la 26ª Conferencia de las Partes sobre el Cambio Climático (COP26) de las Naciones Unidas (ONU) celebrada en Glasgow del 1 al 12 de noviembre de 2021, los resultados finales se resumieron en el Pacto Climático de Glasgow (UNFCCC, 2021), donde se acordó limitar el calentamiento global a 1.5° C, lo cual requiere reducciones rápidas, profundas y sostenidas en las emisiones globales de gases de efecto invernadero, incluido el CO₂ global en un 45% para 2030 en relación con el nivel de 2010 y hasta cero neto alrededor de mediados de siglo, así como como reducciones profundas en otros gases de efecto invernadero (Lennan y Morgera, 2022). Particularmente, México se encuentra dentro de los países que apoyan la iniciativa para frenar las

emisiones de CH₄ con la firma de la Declaración para la Reducción del CH₄, que busca reducir las emisiones contaminantes de dicho gas hasta en un 30% para 2030, de acuerdo con las emisiones

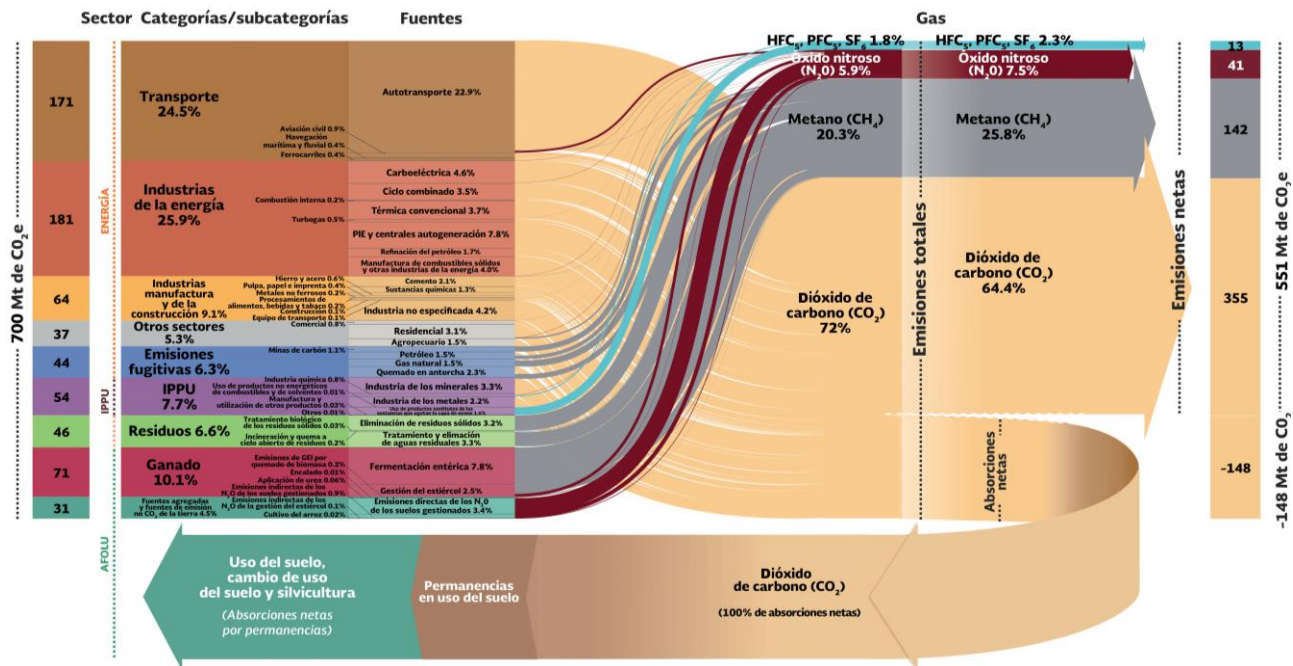


Figura 1. Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero (INECC, 2018). de 2020 (SRE, 2021).

De manera general, alrededor del 44% de las emisiones del sector pecuario son en forma de CH₄, el porcentaje restante, se reparte casi por igual entre N₂O (29%) y CO₂ (27%), de estas emisiones, los rumiantes aportan el 80.87% del total de GEI, teniendo el CH₄ entérico la mayor aportación en los sistemas con un 39.1% de las emisiones (Gerber *et al.*, 2013). En México, el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) presentó el Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero, el cual contiene la estimación de las emisiones antropogénicas de gases y compuestos de efecto invernadero y de la absorción por los sumideros en México para el año 2015 (Figura 1). Según esta información, en México el sector agropecuario genera el 10.1% del total de las emisiones, donde la fermentación entérica representa el 7.8%. (INECC, 2018).

La emisión de CH₄ no solo representa un problema para el ambiente al ser un GEI, también representa una pérdida significativa de consumo de energía (Audsley y Wilkinson, 2014; Beauchemin, 2015; Hristov *et al.*, 2015; Herrero *et al.*, 2016). Por lo tanto, el desafío es desarrollar

dietas y estrategias para reducir la emisión de CH₄ optimizando el uso de energía en las dietas de los rumiantes, mejorando así el rendimiento productivo y reduciendo su impacto ambiental (es decir, el calentamiento global; McGeough *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2016). Existen varios factores que influyen sobre la emisión de CH₄ por rumiantes como la cantidad de alimento consumido, digestibilidad de la dieta, procesamiento de los alimentos, adición de lípidos a la dieta y alteraciones de la microbiota ruminal (Chavez *et al.*, 2006). Por lo que es importante comprender los mecanismos de generación de metano en el rumen.

2.2 Metanogénesis ruminal

Los rumiantes han desarrollado una asociación simbiótica con su microbioma a nivel ruminal que puede sintetizar un rango de enzimas digestivas que actúan sobre la celulosa y hemicelulosa (Knapp, 2014). Esta asociación permite que el animal obtenga nutrientes a través del consumo de forraje. En los rumiantes, la digestión es un proceso de dos etapas: a) degradación enzimática de las fuentes de alimentación en el rumen con la liberación de una variedad de monómeros (azúcares, aminoácidos, glicerol y ácidos grasos, AG), y b) la fermentación de esos compuestos por la microbiota del rumen (bacterias, arqueas metanogénicas, protozoos y hongos; McAllister y Newbold, 2008; Hristov *et al.*, 2013a; Krause *et al.*, 2013; Figura 2).

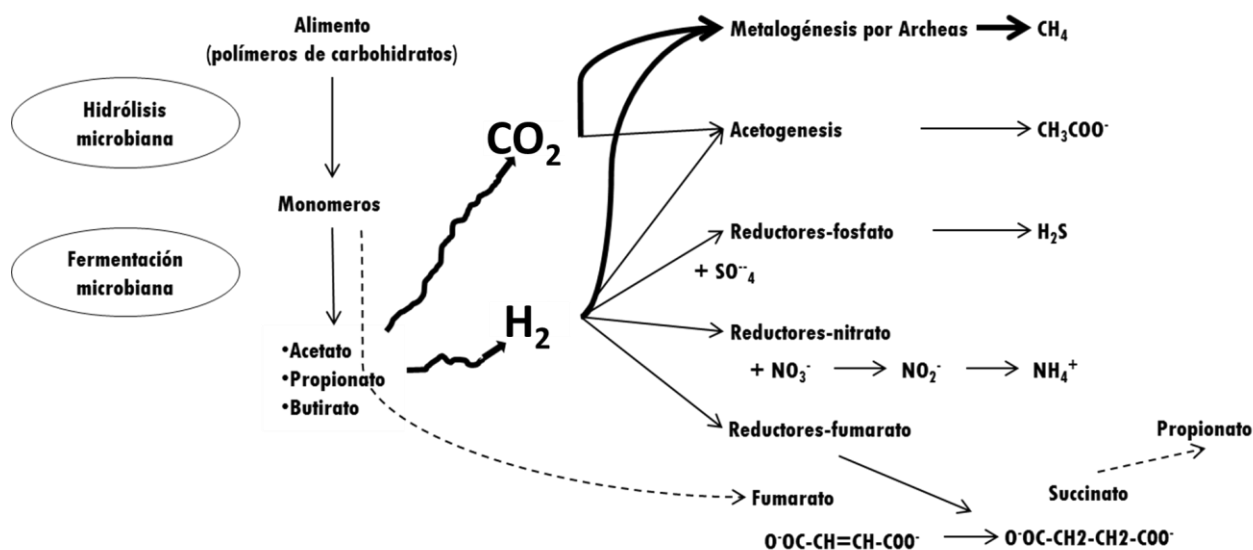


Figura 2. Esquema de la fermentación microbiana y las vías de reducción del H₂ en el rumen (modificado de Morgavi *et al.*, 2010).

Los productos primarios de la fermentación entérica son los ácidos grasos volátiles (AGV; acetato, propionato, y butirato), ácidos de fermentación (lactato), alcoholes (por ejemplo, etanol), succinato y otros AGV de cadena ramificada, además de CO₂, hidrogeno (H₂) y amoníaco (NH₃),

donde la producción de CH₄ es la ruta principal para la eliminación de H₂ de la fermentación (Janssen, 2010). La fermentación pre-gástrica de alimentos ricos en celulosa del complejo retículo-rumen-omasal está intrínseca y estrechamente regulada, por la temperatura (38-42° C), el pH (6-7) y el potencial redox (Eh, -300 a -350 mV) que indica las condiciones anaerobias que se deben mantener el rumen para un óptimo funcionamiento (Hoover y Miller, 1991). Actualmente existen sensores remotos que pueden registrar estos parámetros en tiempo real (Qin *et al.*, 2017). Estas condiciones mantienen la funcionalidad del sistema microbiano ruminal, pero se deben eliminar los AGV y el H₂ para mantener el equilibrio osmótico y el CO₂ para liberar la presión ejercida en el rumen. Los AGV se absorben a través de las paredes del rumen y el omaso y son utilizados por el animal, mientras que el CO₂ se libera al espacio superior del rumen y se pierde a través del eructo o se transporta a través de la circulación hacia los pulmones y se respira (Hoover y Miller, 1991; Relling y Mattioli, 2003). La eliminación del H₂ metabólico se produce a través de la producción de AGV, la bio-hidrogenación de los ácidos grasos insaturados y predominantemente a la conversión a CH₄. Este último proceso es facilitado por las arqueas metanogénicas, de las cuales, se han identificado tres géneros principales (*Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, y *Methanosphaera*) y tres géneros secundarios (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*, y el grupo C del rumen) esta clasificación se basa tanto en el tamaño de la población, así como en su funcionalidad (Janssen y Kirs, 2008; Poulsen *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2013). Las arqueas utilizan el hidrógeno metabólico para facilitar la reducción y re-oxidación de NADH, NADPH y FADH a NAD⁺, NADP⁺ y FAD⁺, respectivamente, produciendo ATP (McNeely *et al.*, 2010; Thauer *et al.*, 2010).

La comunidad metanogénica tiene un grado de maleabilidad en su respuesta al H₂ metabólico a través diferentes vías metabólicas potenciales y reacciones de bio-hidrogenación adicionales (Poulsen *et al.*, 2013). La vía principal generalmente se clasifica como hidrogenotrófica, pero hay otras rutas adicionales que tienen un papel en la eliminación del hidrógeno y son estos procesos alternativos (metilo-trófico y aceto-clástico) los que altera la estequiometría general de la producción de CH₄ y la utilización de hidrógeno por el microbioma del rumen (DasSarma *et al.*, 2009). La relación entre el rendimiento de CH₄ (CH₄/kg CMS) y el consumo de materia orgánica (CMO) digerible por parte del animal no es lineal y no es predecible (Alford *et al.*, 2006;).

Hasta este punto, no es posible vincular la producción de CH₄ y la estructura y funcionalidad del microbioma ruminal. Las principales vías metabólicas (Janssen y Kirs, 2008; Knapp *et al.*, 2014) son las siguientes:

- Hidrogeno-trófica: $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
- Metilo-trófica: $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
- Aceto-clástica: $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4$ (menor en el rumen)

Además, hay algunos grupos de arqueas de fisiología desconocida que habitan en el rumen, dentro de las cuales se incluyen un gran grupo llamado “*Rumen Cluster C*”, que puede formar una gran parte de la comunidad (Janssen y Kirs, 2008), y utilizan una gama de compuestos donantes de metilo y CO₂, lo que sugiere que hay otras vías aún por identificar que producen CH₄ (Poulsen *et al.*, 2013).

Del total de CH₄ producido por un animal, la mayor parte se genera en el rumen (82-90 %), este se acumula en el espacio superior del rumen y se libera directamente al medio por el eructo, y el restante (10-18 %) se elimina a través de la respiración y por medio de las flatulencias el CH₄ generado en el tracto inferior como resultado de la fermentación del intestino después de la digestión (Eckard *et al.*, 2010; Huhtanen *et al.*, 2015). Si el CH₄ emitido por el animal se estima como energía digerible, este puede representar una pérdida energética del 2-12 % (Morgavi *et al.*, 2010; Moumen *et al.*, 2016), que puede ser potencialmente utilizable por el animal. Una forma de reducir estas pérdidas es a través de la manipulación de la dieta en busca de promover la eficiencia de fermentación ruminal para mejorar la utilización de los alimentos (Makkar y Vercoe, 2007).

2.3 Biotecnología aplicada al estudio del microbioma ruminal

Los avances en técnicas de biología molecular permiten una cuantificación directa de diferentes especies en el líquido ruminal mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real donde la aplicación de estas técnicas representa una mejora en la investigación (Onime *et al.*, 2013). La técnica de PCR tiene la habilidad de estimar un objetivo dirigido de bacterias con alta sensibilidad y ha sido usada para analizar varias muestras ambientales, tales como agua, sólidos y contenido ruminal (Koike y Kobayashi, 2001).

Debido a la aplicación de estas técnicas, se ha demostrado que los efectos de las arqueas son dependientes principalmente de los sustratos en la dieta y de las características químicas y físicas de la misma, así como de las interacciones con otras poblaciones (Cambrá-López *et al.*,

2008; Mohammed *et al.*, 2011; Varón, 2015). Así mismo, mediante la utilización de técnicas para la amplificación de secuencias de ADN se ha revelado que los metanógenos predominantes en la colonización del rumen pertenecen al orden *Metanobacterial*, mientras que los órdenes *Metanosarcinal*, *Metanomicrobial* y *Metanococcal* están presentes en niveles más bajos (Ramírez *et al.*, 2014).

Algunos estudios señalan que la proporción de forraje en la dieta puede influir en el tamaño de la población o la proporción de bacterias celulolíticas en el rumen (Machmüller *et al.*, 2003; Beauchemin y McGinn, 2005; McGeough *et al.*, 2019). Sin embargo, un estudio realizado con diferentes proporciones de forraje en la ración realizado por Koike y Kobayashi (2001) muestran que el número de especies celulolíticas varía dentro y entre animal en diversas condiciones. Mientras que Zhou *et al.* (2010) especulan que los cambios en la diversidad metanogénica fueron relacionados a la dieta y a las características del huésped, por lo que el conocimiento de los factores que influyen en la diversidad de las arqueas metanogénicas y el total de las poblaciones metanogénicas podrían proporcionar alternativas para reducir con éxito las emisiones de CH₄ (Mohammed *et al.*, 2011).

La capacidad de estimar los cambios en las emisiones de CH₄ es fundamental. Por lo que las técnicas que se utilizan son importantes para conocer cual se puede ajustar mejor a las condiciones experimentales de cada investigación y objetivos. A continuación, se describen brevemente algunas de estas técnicas.

2.4 Técnicas utilizadas para medir metano en los animales

2.4.1 Cámaras respiratorias

Las cámaras de respiración son el “estándar de oro” para la medición de emisiones de CH₄ y normalmente se emplea para validar otros sistemas de medición (Blaxter y Clapperton, 1965; Knapp *et al.*, 2014). En este sistema se pueden realizar mediciones continuas de un individuo por hora y hasta varios días, se ha determinado que 3 días efectivos producen información válida (Lines *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2011; Storm *et al.*, 2012). Este sistema provee un alto nivel de exactitud y hace posible controlar y medir una gran cantidad de parámetros relacionados a la emisión de varios gases (Tremblay y Massé, 2008). Sin embargo, además del alto costo de instalación, la mayor desventaja de este método es el confinamiento al que el animal es sometido, este ambiente restringido afecta la expresión del comportamiento “normal” e incrementa el estrés en el animal,

lo que resulta en una reducción del CMS lo que promueve variaciones en los resultados (Garnsworthy *et al.*, 2012).

2.4.2 Trazador, hexafluoruro de azufre (SF₆)

La técnica del trazador de SF₆ fue descrita por Johnson *et al.* (1994) en 1993-1994. Se basa en el hecho de que las emisiones de CH₄ se pueden medir si se conoce la tasa de emisión de un gas trazador, el cual debe reunir ciertas características como el ser estable, no tóxico, inerte fisiológicamente para los animales, mezclarse igual que el CH₄ en el rumen, además de ser detectado en cantidades mínimas, características que se encontraron en el SF₆ (Lester y Greenberg, 1950; Zimmerman, 1993; Johnson *et al.*, 1992; Storm, 2012; Brouček, 2014; Okpara, 2018). Además, es de origen sintético y no se produce como parte de ningún proceso biológico (Hill *et al.* 2016). De manera general, las concentraciones de fondo en la naturaleza del SF₆ son muy bajas, según Rigby *et al.* (2010) estas pueden llegar a 6 pmol/día, y como trazador varía entre 0.01 y 0.03 mmol/día (Lasseby *et al.*, 2011).

Con esta técnica se pueden realizar mediciones directas e individuales de las emisiones de CH₄ de los animales (Goopy *et al.*, 2016). Los tubos de permeación se llenan con SF₆ (el tamaño varía según la especie: bovinos o pequeños rumiantes), son colocados en baño María a 39° C y se pesan constantemente por un periodo de tiempo determinado para conocer la tasa de liberación, seleccionando aquellos tubos con la tasa de liberación estable y dentro del rango para introducir directamente en el rumen de los animales seleccionados para el estudio (Storm *et al.*, 2012). En los animales se coloca un colector presurizado y con restricción de flujo que colecta el SF₆ y el CH₄ lenta y constantemente cerca de las fosas nasales (Zimmerman, 2013; Brouček, 2014; Okpara, 2018). La recomendación es tomar muestras durante 24 h, en periodos de alrededor de cinco días consecutivos, sin olvidar recolectar muestras de aire de fondo de forma simultánea (Hammond *et al.*, 2016). La concentración de SF₆ y CH₄ en el colector, y las colocadas en la cercanía para captar las concentraciones de fondo, se determina mediante cromatografía de gases (Brouček, 2014). La siguiente ecuación se utiliza para determinar la emisión de CH₄ utilizando la técnica de SF₆ (Patra, 2016).

$$\text{CH}_4 \text{ (g /día)} = \text{SF}_6 \text{ (g /día)} \times ([\text{CH}_4]_{\text{c}} - [\text{CH}_4]_{\text{f}}) / ([\text{SF}_6]_{\text{c}} - [\text{SF}_6]_{\text{f}})$$

Donde [CH₄]_c y [SF₆]_c son las concentraciones de CH₄ y SF₆ en el colector, respectivamente; mientras que [CH₄]_f y [SF₆]_f son las concentraciones de CH₄ y SF₆ en el

ambiente de fondo, respectivamente (Patra, 2016). Al conocer la tasa de liberación de SF₆ de la cápsula ruminal y la tasa de colección del aire espirado, es posible estimar el volumen de emisión de CH₄ por minuto, hora o día (Johnson *et al.*, 1994). Los datos técnicos específicos de la técnica se encuentran descritos por Jonker y Waghorn (2020).

Sin lugar a duda, la técnica del trazador de SF₆ es una de las indicadas cuando el objetivo es evaluar las emisiones de CH₄ en animales en condiciones de pastoreo (Johnson *et al.*, 1994; Bonilla y Lemus, 2012). Sin embargo, el SF₆ es un gas de efecto invernadero con un PCG¹⁰⁰ de 22 800 (Piñares-Patiño *et al.*, 2012) por lo que su utilización debe conducirse con responsabilidad.

2.4.3 Sistema Greenfeed

GreenFeed® (GF) es un sistema de monitoreo individual independiente de corta duración que es comercializado por C-lock Inc. (Rapid City, Dakota del Sur, E.U.). Este método se basa en obtener varias muestras de las emisiones de CH₄ individuales a lo largo del día para estimar la emisión diaria promedio de CH₄ de un animal a lo largo de días, semanas o meses (Hammond, *et al.*, 2016). Para obtener datos precisos el animal debe tener la cabeza dentro del medidor por al menos 3 min durante cada visita, por lo que se utiliza un alimento atrayente que por lo general es alimento concentrado (Okpara, 2018; Goopy *et al.*, 2016), con lo que además de atraer al animal, lo mantiene en posición para que se realice el muestreo del aire espirado de manera continua (Zimmerman *et al.*, 2013). La emisión diaria de CH₄ (L/min) se calcula usando la tasa de flujo de aire volumétrico (F aire (i)) ajustada por visita y corregida por la tasa de captura.

$$\text{CH}_4 \text{ (L/min)} = \text{Cp}(i) \times ([\text{CH}_4]\text{c}(i) - [\text{CH}_4] \text{ b}(i)) \times \text{F aire}(i) / 106$$

Donde Cp(i) es la tasa fraccionaria de captura de aire en el tiempo i; [CH₄]c(i) y [CH₄]b(i) son las concentraciones de gas capturado (ppm) y gas de fondo de CH₄ (ppm), respectivamente, en el momento i; y F aire (i) es la tasa de flujo de aire volumétrico (L/min) medida sobre la base de gas seco en el momento i; (Huhtanen *et al.*, 2015; Patra, 2016). Las mediciones con duración suficiente (al menos 3 min) y al menos 30 observaciones fueron suficientes para obtener datos confiables de emisión de CH₄, sin importar las veces al día que se obtuvieron las mediciones (Arthur *et al.*, 2017; Hristov *et al.*, 2018).

Una posible desventaja de la técnica podría ser que el consumo del alimento atrayente que puede interferir con las comparaciones de tratamientos dietéticos ya que puede variar por individuo,

también se debe tomar en cuenta que los animales necesitan un periodo de adaptación previo y se tiene que descartar a los que no son aptos, además de considerar que los equipos necesitan calibración y las pruebas de recuperación de gas, con un estándar, deben realizarse de forma rutinaria (Hristov *et al.*, 2015; Tedeschi *et al.* 2022).

2.4.4 Sensores infrarrojos

Este método fue desarrollado en un sistema de producción lechera “intensiva” totalmente automatizado (*sniffer method*; Garnsworthy *et al.*, 2012). En estos sistemas, las vacas son ordeñadas al entrar a los robots ordeñadores por voluntad propia y cada vaca recibe una cantidad de concentrado proporcional a la producción diaria de leche. Cuando las vacas están comiendo el suplemento proporcionado, liberan CH₄ con cada eructo, el cual se mezcla con el aire del comedero. Los sensores succionan una fracción de este aire y miden la cantidad de CH₄ a través de un sensor infrarrojo y se expresa en mA (1% CH₄; Guardian Plus, Edinburgh Instruments Ltd., Livingston, Reino Unido). La toma de muestra es continua y todas lecturas de CH₄ son guardadas por segundo. Con los datos obtenidos (CH₄, mA) se generan gráficas en las que cada eructo se registra como un pico de CH₄ espirado, y usando la frecuencia, la amplitud y el área bajo la curva de cada pico se estima la producción de CH₄ durante la ordeña (Garnsworthy *et al.*, 2012). Esta información representa una tasa de emisión, o sea la cantidad de CH₄ emitido durante un periodo de tiempo (ordeña) por lo que no refleja la producción diaria de CH₄ a menos que se apliquen los ajustes necesarios para considerar los eventos que ocurren durante todo el día (comportamiento de alimentación, descanso y rumia de los animales; Hegarty, 2013). Estos ajustes fueron obtenidos en los experimentos de desarrollo del sistema al momento de ser comparado y validado con las emisiones diarias (24 horas continuas) obtenidas a través de cámaras de respiración (Garnsworthy *et al.*, 2012). A pesar de esto, este sistema ha demostrado su utilidad para la comparación intra y entre animales ya que permite evaluar las variaciones de emisiones individuales y determinar la variación que existe entre individuos (cercana al 30%; Garnsworthy *et al.*, 2012), lo que abre las posibilidades para la selección de animales con baja emisión de CH₄. Aunado a esto, este sistema tiene la ventaja de ser altamente adaptable, de bajo costo y consistente, lo que le da un potencial de medición de la emisión de CH₄ en ganado, no sólo en sistemas lecheros intensivos, sino también en sistemas de doble propósito e incluso corrales de engorda, lo que lo hace factible para ser adaptados a las condiciones del trópico mexicano (Hernández, 2017).

2.5 Estrategias de mitigación de metano

Existen diversas clasificaciones para agrupar las estrategias de mitigación de CH₄ entérico, como se muestra en la Figura 3, de manera general, podemos dividir las estrategias en las que involucran una selección genética de los animales, aquellas que manipulan las condiciones del rumen y en las que se involucra la manipulación de la dieta, así como la vacuna contra los metanógenos del rumen. De cada una de estas estrategias se encuentran diversas opciones, las cuales se abordarán a continuación.

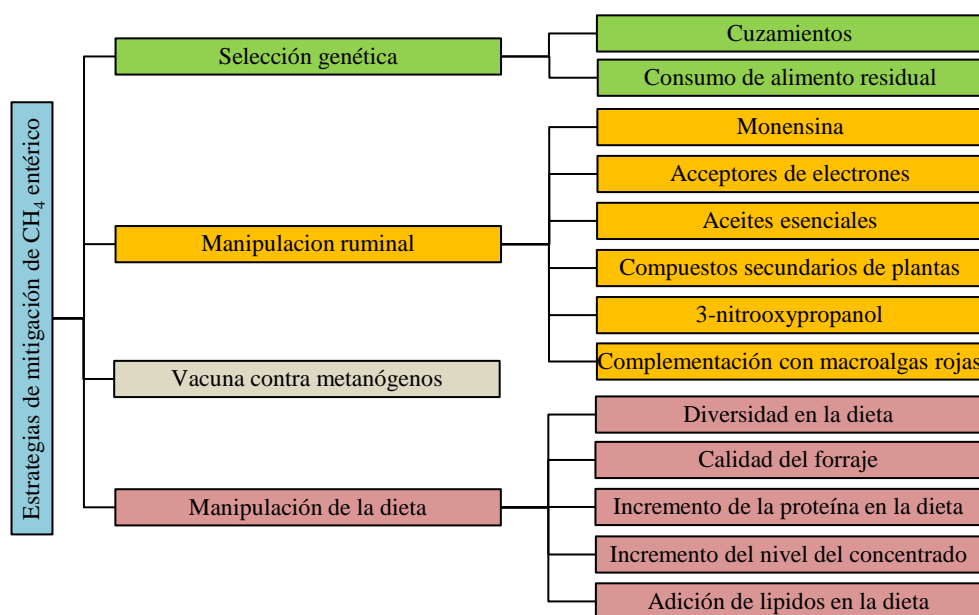


Figura 3. Estrategias de mitigación de CH₄ entérico y sus derivados, adaptado de de Souza et al. (2021).

2.5.1 Selección genética.

La selección genética de animales es una estrategia eficaz para mitigar las emisiones de CH₄ entérico y, al mismo tiempo, mantener o aumentar el rendimiento de los animales (Kumar *et al.*, 2014). Sin embargo, estos resultados se pueden confundir dependiendo los objetivos del estudio, ya que puede incrementar las emisiones de CH₄ entérico por animal (producción de CH₄ g/d) así como por el CMS (rendimiento de CH₄ g/kg CMS), pero disminuye el impacto de emisiones por producción de leche (intensidad de CH₄, g/kg de leche), es decir, se necesitarán menos animales para producir los mismos kilogramos de leche (de Souza *et al.*, 2021). La correlación genética entre la producción de CH₄ y la producción de leche va de 0.49 a 0.54, esto indica que si la selección genética se enfoca a disminuir la producción de CH₄ es probable que

también baje la producción de leche (Breider *et al.*, 2019). Al aumentar la productividad animal mediante la mejora del potencial genético de los animales a través de cruces planificados puede ser una estrategia eficaz para disminuir la intensidad de CH₄ (Capper y Bauman, 2013; Hristov *et al.*, 2013b). de Souza *et al.* (2021) por medio de un metaanálisis, encontraron que la cruce de animales (Holstein × Gyr) a pesar de incrementar la ganancia diaria de peso (GDP) en vacas F1 no disminuyó la intensidad de emisiones (CH₄, g/kg de GDP), lo que indica que el mejoramiento genético para esas razas ha tenido como objetivo aumentar la producción de leche sobre la producción de carne (de Souza *et al.*, 2021). Capper y Bauman (2013) destacaron la importancia de considerar el aumento de la productividad animal en la discusión sobre la reducción de las emisiones de consumo de energía bruta (CEB). Dado que se espera que la disponibilidad de tierras de cultivo por persona disminuya en un 25% para 2050, existe una necesidad de que las estrategias efectivas de mitigación de GEI estén vinculadas con mejores rendimientos para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos (Alexandratos y Bruinsma, 2012). Sin embargo, Beauchemin *et al.* (2020) mencionan como una limitación el hecho de que los índices económicos desarrollados para la selección comercial de animales se basan en múltiples rasgos ponderados por su valor económico.

Consumo de alimento residual

El consumo de residual alimento (RFI, por sus siglas en inglés, *Residual Feed Intake*) es una medida de la diferencia entre el consumo de alimento real y el calculado en función de los requisitos de mantenimiento y producción (GDP en bovinos productores de carne o producción de leche en vacas lecheras) cuando se ajusta por pérdidas de energía y el peso de los animales, de tal manera que los animales más eficientes comen menos de lo calculado (RFI bajo) y los animales menos eficientes comen más de lo calculado (RFI alto; Archer *et al.*, 1999; Nkrumah *et al.*, 2006). El RFI es un rasgo moderadamente heredable, y hay evidencia de que la variación en RFI se explica por los requerimientos de energía de mantenimiento (Herd y Bishop, 2000; Herd y Arthur, 2009). En una extensa revisión realizada por Basarab *et al.* (2013) concluyen que los animales con un RFI bajo, tendrán una menor producción de CH₄ (g CH₄/día) en comparación con animales con un RFI alto, debido a un menor consumo de alimento con un nivel igual de producción y peso corporal, aunque el supuesto incremento en la eficiencia alimenticia de los animales con un RFI bajo queda en entredicho, al menos como estrategia para disminuir las emisiones de CH₄, por las inconsistencia en el rendimiento de CH₄ (CH₄, g/kg CMS). También se ha asociado un menor tiempo de retención en el rumen de la digesta en animales con RFI bajo con una disminución en la digestibilidad del

alimento (Løvendahl *et al.*, 2018). Un opción para la selección de animales con base a su RFI es la producción de CH₄ residual, la cual se calcula como el residuo de la regresión de la producción de CH₄ contra variables de importancia económica como lo son CMS, GDP y producción de leche (Beauchemin *et al.*, 2022). Con este enfoque, Manzanilla-Pech *et al.* (2021) reportaron correlaciones positivas entre el CH₄ residual y el RFI en un total de 15 320 registros de producción de CH₄ de 2 990 vacas pertenecientes a 4 países (Canadá, Australia, Suiza y Dinamarca) que no habían sido seleccionadas por ninguna característica, lo que implica que aquellos animales que produjeron menos CH₄ convirtieron el alimento en leche de manera más eficiente.

2.5.2 Manipulación ruminal

Algunas de las estrategias más utilizadas para disminuir las emisiones de CH₄ a través de métodos que manipulan alguna o algunas condiciones ruminales se describen a continuación.

Monensina

La monensina, tiene el potencial de disminuir el rendimiento de CH₄ y la pérdida de energía de CH₄ como proporción del CEB o Y_m, en el ganado en crecimiento (Moss *et al.*, 2000; Beauchemin *et al.*, 2022). Es reconocida por aumentar la eficiencia alimenticia al inhibir las bacterias grampositivas sobre las gramnegativas, lo que conduce a una mayor producción de propionato en el rumen (Russel, 1987; McGuffey *et al.*, 2001). Este aumento en la proporción propionato:acetato, aunado a la disminución del número de protozoos ruminales, que generan hidrógeno adicional en el rumen junto a la actividad bacteriana podrían ser beneficiosos para disminuir la emisión de CH₄ entérico (Beauchemin *et al.*, 2008; Cottle *et al.*, 2011). Sin embargo, la literatura es inconsistente, en particular, con respecto al efecto de la monensina en la emisión de CH₄ en sistemas de pastoreo (Grainger *et al.*, 2008; Waghorn *et al.*, 2008). Según Hristov *et al.* (2013a) esta inconsistencia se debe principalmente a que el efecto de mitigación potencial depende de la dosis, el consumo de alimento y la composición de la dieta. En un metanálisis realizado por Appuhamy *et al.* (2013) indica un efecto de mitigación moderado (19 g/d en novillos y 6 g/d en lecheras) de la monensina en el rendimiento de CH₄ (CH₄, g/kg CMS). Con frecuencia, se discute en la literatura que el efecto de mitigación de la monensina puede ser temporal y que la presión pública para reducir el uso de antibióticos en los sistemas ganaderos puede limitar su uso en el futuro (Beauchemin *et al.*, 2008).

Aceptores de electrones

Los aceptores de electrones son compuestos que extraen electrones que potencialmente se dirigen a la formación de CH₄ y se utilicen en vías alternativas, estos pueden ser de origen orgánico, como pueden ser el fumarato y el malato, e inorgánicos como el nitrato (Moss *et al.*, 2000; Beauchemin *et al.*, 2022). Diversos estudios han informado que la utilización de nitratos como aditivo es eficaz para disminuir las emisiones de CH₄ de los rumiantes, incluido su efecto persistente para el ganado lechero y de carne (Van Zijderveld *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2020), por otra parte, los efectos del fumarato y malato sobre la productividad animal han sido inconsistentes. El malato estimula *Selenomonas ruminantium* y puede ayudar a prevenir la acidosis derivada de la producción de lactato al promover el metabolismo de este (Carro y Ungerfeld, 2015).

Actualmente, la implementación del nitrato como estrategia para disminuir las emisiones de CH₄ entérico podría ser factible dependiendo del precio del mercado de bonos de carbono en los países que así lo manejen, la mitigación de las emisiones de amoníaco y N₂O del estiércol ya que si se complementa una dieta con suficiente N con nitrato, el N adicional se eliminará en el medio ambiente y aumentará las emisiones de N₂O a la atmósfera y contaminará las aguas subterráneas con nitrato, también dependerá de la disponibilidad de procedimientos seguros de suministro de alimentos para identificar y controlar posibles intoxicaciones (Beauchemin *et al.*, 2022). La alimentación de rumiantes con fumarato y malato está limitada en gran medida por el costo de estos insumos en la alimentación, debido a los niveles relativamente altos de inclusión necesarios (16.7 g/kg MS; Feng *et al.*, 2020) y los efectos relativamente pequeños (10 a 23%) sobre la producción de CH₄ (CH₄, g/kg MS; Carro y Ungerfeld, 2015; Beauchemin *et al.*, 2022).

Aceites esenciales

Los AE son una mezcla de metabolitos secundarios lipofílicos que se obtienen a partir de fracciones volátiles de plantas extraídos por algún proceso de destilación (Benchaar y Greathead, 2011). La inhibición del metano mediada por los aceites esenciales (AE) podría implicar principalmente la supresión de metanógenos y microorganismos productores de hidrógeno, aunque la inclusión de AE o sus constituyentes en las dietas puede no mostrar cambios o una disminución en dosis altas en las concentraciones de AGV como resultado de una digestión reducida de nutrientes, aunque en algunos estudios *in vitro* e *in vivo* a largo plazo, las disminuciones beneficios

asociados con AE disminuyen con el tiempo debido a los cambios en las poblaciones microbianas o la adaptación de especies microbianas a los AE (Benchaar *et al.*, 2008; Patra y Saxena, 2009a). Algunas fuentes de aceites esenciales como el orégano, el tomillo, el aceite de ajo y sus derivados reducen la producción de CH₄ *in vitro* (Cobellis *et al.*, 2016), aunque cuando evalúan en experimentos *in vivo* los resultados de los han sido menos concluyentes (Benchaar y Greathead, 2011; Hristov *et al.*, 2022). En consecuencia, se necesitan más estudios en animales a largo plazo para investigar hasta qué punto los microorganismos del rumen se adaptan a una dosis continua de estas sustancias (Beauchemin *et al.*, 2022).

Compuestos secundarios de plantas

Las plantas pueden tener una amplia variedad de compuestos secundarios (taninos, mimosina, saponinas, flavonoides y aceites esenciales principalmente) que pueden afectar el microbioma del rumen y la emisión de CH₄ entérico, la estrategia de alimentación con taninos se ha estudiado más intensamente por su efecto de mitigación de CH₄ (Ku-Vera *et al.*, 2020). Los taninos pertenecen a una subclase de polifenoles vegetales y generalmente se clasifican según sus estructuras químicas como taninos hidrolizables o condensados (TH y TC, respectivamente; Vasta *et al.*, 2019). Las investigaciones más recientes se han centrado en evaluar fuentes de TC en lugar de TH debido al potencial efecto tóxico de estos últimos (Beauchemin *et al.*, 2020).

Las plantas con taninos están muy extendidas e incluyen varios arbustos, árboles, especies de plantas leguminosas y no leguminosas, principalmente en regiones de clima cálido (Hristov *et al.*, 2013a; Ku-Vera *et al.*, 2020). Otro compuesto importante en la reducción de emisiones de CH₄ es la mimosina, la cual es un aminoácido libre tóxico responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas y del crecimiento de varias bacterias y hongos grampositivos (Soltan *et al.*, 2017). Soltan *et al.* (2017) postulan que la mimosina tiene un efecto para estimular la acetogénesis disminuyendo la metanogénesis ruminal. Por otra parte, las saponinas son glucósidos de alto peso molecular que se encuentran en una amplia variedad de arbustos y árboles tropicales (Canul-Solis *et al.*, 2020; Ku-Vera *et al.*, 2020). Su efecto antimetanogénico a menudo se atribuye a su acción sobre las membranas celulares de los protozoos del rumen, afectando así a las arqueas metanogénicas que están asociadas simbióticamente con ellos (Patra y Saxena, 2009b). El uso de fuentes vegetales que puedan mitigar el CH₄ entérico que contengan taninos y/o saponinas, que generalmente tienen un alto contenido de PB y bajo contenido de fibra, es particularmente importante para los sistemas de

pastoreo y pequeños agricultores en la región tropical, especialmente durante la estación seca cuando la calidad general de los pastos es deficiente.

3-nitrooxypropanol

El 3-nitrooxypropanol (3-NOP) y la variante de etilo, etil-3-nitrooxypropanol, fueron desarrollados por DSM Nutrition Products Ltd. (Kaiseraugst, Suiza) (Duval y Kindermann, 2012). El 3-NOP se une al sitio activo de la enzima metil-CoM reductasa que cataliza el último paso en la reducción de CO₂ a CH₄ por parte de las *Archaea* metanogénicas hidrogenotróficas (Duin *et al.*, 2016). Los experimentos de laboratorio y con animales muestran una reducción significativa del CH₄ cuando se agrega 3-NOP a la dieta (Duval y Kindermann, 2012; Romero-Perez *et al.*, 2014; Reynolds *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022). El efecto del 3-NOP sobre la producción de CH₄ está relacionado con el nivel de inclusión en la dieta (Yu *et al.*, 2021) y su efecto está correlacionado negativamente por la concentración de FND en la dieta (Dijkstra *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2021).

A medida que se aumenta la proporción de 3-NOP hasta llegar al 2.8% de la dieta se puede observar una reducción lineal de las emisiones de CH₄ tanto en ovejas, bovinos productores de carne y vacas lecheras (Jayanegara *et al.*, 2018; Kebreab *et al.*, 2022). El nivel de inclusión promedio del 3-NOP va alrededor de 144 mg/kg de MS para animales productores de carne y de 81 mg/kg de MS para animales lecheros, con estos niveles de inclusión el 3-NOP puede reducir la producción de CH₄ en torno a un 30% (Dijkstra *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020) aunque se han obtenido descensos del 70-80% o más en algunos estudios con dietas altas en concentrados (Yu *et al.*, 2021; McGinn, *et al.*, 2019). Romero-Perez *et al.* (2015) utilizaron una dosis de hasta 2.7 g por animal por día de 3-NOP en bovinos productores de carne con un 60% de forraje (MS) en la dieta durante 112 días y reportaron una disminución de hasta el 33% en las emisiones de CH₄ sin efectos negativos sobre la digestibilidad.

Dijkstra *et al.* (2018) realizaron un metaanálisis donde evaluaron 11 experimentos con bovinos productor de carne y lecheros que fueron suplementados con 3-NOP y reportan que la inclusión media fue de 123 mg/kg de CMS, con lo cual se redujo la producción de CH₄ en un 32.5% y el rendimiento en un 29.3%.

En el metaanálisis realizado por Jayanegara *et al.* (2018) evaluaron 12 experimentos donde se adicionó 3-NOP a ovinos, bovinos productores de carne y leche donde la inclusión promedio

fue de 100 mg/kg de MS, con lo que vieron disminuido el rendimiento del CH₄ un 19.2% y la intensidad en un 21.1% sin afectar el CMS.

La adición de 3-NOP disminuye la producción de CH₄, Sin embargo, se necesitan inclusiones más altas en bovinos productores de carne que en los productores de leche (Dijkstra *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). Esto se debe a una mayor CMS en bovinos lechero, lo que da como resultado más sumideros de H₂ alternativos y, por lo tanto, una menor concentración del sitio de acción (metil-CoM reductasa; Dijkstra *et al.*, 2018). Al no poder canalizar el H₂ para la formación de CH₄, se esperaría un aumento en la energía disponible para el animal (Black *et al.*, 2021) debido al aumento de las vías consumidoras de H₂ (producción de propionato) y reducir las vías que producen H₂ (producción de acetato), esto como mecanismos reguladores de H₂ en el rumen (Jayanegara *et al.*, 2018).

La utilización del 3-NOP es más factible de adoptar en sistemas de producción donde los animales se alimenten directamente en el comedero, ya que en sistemas en condiciones de pastoreo se complicaría la dosificación (Romero-Pérez y Beauchemin, 2018). Aunque la naturaleza sintética del 3-NOP puede ser una barrera para su adopción debido a la creciente percepción pública negativa hacia este tipo de productos, así como el impedimento para el uso en producciones orgánicas, el uso de un producto como el NOP en la producción de carne y leche puede resultar atractivo ya que disminuye el impacto ambiental de CH₄ produciendo alimentos de forma sustentable (Romero-Pérez y Beauchemin, 2018). Actualmente ya está autorizada su comercialización en varios países, incluyendo México. Se espera que próximamente se pueda conseguir.

Complementación con macroalgas rojas

Se ha encontrado que algunas algas rojas tienen un potencial para disminuir las emisiones de CH₄ entérico en rumiantes, en particular las que pertenecen a el género *Asparagopsis*, debido a su capacidad para sintetizar y encapsular análogos de CH₄ halogenados dentro de células glandulares especializadas como mecanismo de defensa natural (Paul *et al.*, 2006). Entre los principales metabolitos halogenados, se destacan el bromoformo y ácido dibromoacético (Mata *et al.*, 2011). El alga *Asparagopsis* contiene aproximadamente 0.22 mg/g de MS de 22 metabolitos halogenados diferentes, pero varía entre cepas y eco variedades (Machado *et al.*, 2016; Mata *et al.*, 2017). Las concentraciones de los compuestos bioactivos dependen en gran medida de los

procedimientos de secado, siendo la liofilización la más eficaz (Stefenoni *et al.*, 2021). Los análogos del CH₄ halogenado, como el bromoclorometano, inhiben el último paso de la metanogénesis en las arqueas metanogénicas al reaccionar con la vitamina B12 (Wood *et al.*, 1968). Kinley *et al.* (2020) mostró que la inclusión de solo 0.2 % de MO en el alimento como *Asparagopsis* seca redujo las emisiones de CH₄ en un 98 % y aumentó la ganancia de peso en un 42 %, sin efectos negativos sobre el consumo de alimento o la función del rumen en bovinos productores de carne. Se han encontrado disminuciones similares en la producción de CH₄ del 55% al 80% en vacas lecheras alimentadas con 0.5% de MS de *Asparagopsis taxiformis* (Stefenoni *et al.*, 2021). De manera similar, se observó una disminución en la producción de CH₄ del 67 % cuando *Asparagopsis armata* se ofreció a una inclusión del 1 % en una dieta para vacas en producción lechera sin que se observaran residuos en la leche (Roque 2019). Li, *et al.* (2016) y Stefenoni, *et al.* (2021) sugieren que la palatabilidad de las dietas que contienen *Asparagopsis* puede reducirse, particularmente en concentraciones más altas en la dieta. Muizelaar, *et al.* (2021) encontraron que las vacas lecheras a las que se les ofrecieron suplementos dietéticos con un 6.5 % o más de *Asparagopsis* rechazaron regularmente el alimento y seleccionaron en contra de estos alimentos. Respecto al periodo de la actividad metanogénica de *Asparagopsis*, Stefenoni, *et al.* (2021) reportan que esta disminuye a los cuatro meses después de ser incorpora a las raciones mixtas totales.

La exposición oral prolongada de animales a altas concentraciones de bromoformo puede causar tumores hepáticos e intestinales; por lo tanto, la EPA (*Environmental Protection Agency*, por sus siglas en inglés) clasificó el compuesto en el Grupo B2: probable carcinógeno humano (Guidelines for Carcinogen Risk Assessment; U.S. EPA, 1986). En animales alimentados con *Asparagopsis* se ha informado una acumulación de yodo en la carne (Roque *et al.*, 2021) y de yodo y bromuro en la leche (Stefenoni *et al.*, 2021), estos investigadores indican una concentración de yodo en la leche de tres mg/L. En niños menores de tres años, el consumo de yodo puede llegar a ser 15 veces superior al máximo tolerable si consumen un L de leche al día (Lean *et al.*, 2021). Por lo que son necesarios más estudios donde se encuentre la dosis indicada en la que no se encuentren residuos en el producto ni alteraciones histológicas en los animales (Glasson *et al.*, 2022). Las investigaciones sobre estas algas siguen explorándose, una estrategia a investigar sería desarrollar alguna tecnología para suplementar en animales en pastoreo.

2.5.3 Vacuna contra metanógenos

Otra estrategia probada para la mitigación del CH₄ es el desarrollo de vacunas contra los metanógenos que podrían provocar la respuesta inmunitaria de los rumiantes mediante la producción de anticuerpos contra los metanógenos (Wright *et al.*, 2004; Wedlock *et al.*, 2010). La estrategia es particularmente atractiva porque requeriría solo uno o dos tratamientos en animales jóvenes para un efecto de por vida y la práctica es aplicable a todos los sistemas de producción de rumiantes. Las emisiones de CH₄ se redujeron en un 8 % en borregos vacunados contra una mezcla de metanógenos ruminales (Wright *et al.*, 2004). Una reducción del 20% en las emisiones de CH₄ se consideró altamente probable cuando se examinó el "repertorio genético completo" de *Archaea* para identificar motivos comunes a todas las *Archaea*, pero no a las bacterias del rumen (Wedlock *et al.*, 2013). Se están realizando investigaciones en Nueva Zelanda para identificar posibles antígenos y desarrollar una vacuna (Subharat *et al.*, 2015). Los intentos de reducir las emisiones de CH₄ a través de la vacunación han arrojado resultados variables, desde un aumento de CH₄ del 20 % hasta una reducción de CH₄ del 69 %, y la mitad de los experimentos no tuvieron éxito (Baca-González *et al.*, 2020). Para que una vacuna tenga éxito, se deben transferir altas concentraciones de anticuerpos IgG e IgA antimetanogénicos de *Archaea* de la sangre a la saliva, lo que ha resultado difícil de lograr (Subharat *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Williams, *et al.* (2009) no encontraron ningún efecto de la vacunación sobre las emisiones de CH₄ o sobre el número de organismos metanogénicos dentro del rumen. Estos resultados mixtos sugieren que el éxito probable de una estrategia de vacunación para reducir sustancialmente las emisiones de CH₄ de los rumiantes en pastoreo es menor en comparación con otras estrategias, presentando una limitación en la aplicación de este método, debido a la variación dentro de las diferentes especies metanogénicas presentes en el microbioma ruminal y dependiendo de la dietas específicas en diferentes ubicaciones geográficas, lo que dificulta el diseño de una vacuna universal (Wright *et al.*, 2007).

2.5.4 Manipulación de la dieta

Entre las estrategias nutricionales de la mitigación de CH₄, la manipulación dietética es un enfoque simplista y pragmático que puede garantizar una mejor productividad animal y una menor emisión de CH₄ (Beauchemin, 2008). La manipulación dietética puede reducir la emisión de CH₄ hasta en un 40%, dependiendo del grado de cambio y la naturaleza de la intervención del forraje (Benchaar *et al.*, 2001). En general, una mejora en la calidad de la nutrición en los animales puede

reducir alrededor de un 30% las emisiones de CH₄, además de la opción de mejorar manejos en la granja que también disminuyan las emisiones, como podría ser el procesamiento de las excretas (Mosier *et al.*, 1998).

Incremento del nivel del concentrado

El aumento de los niveles de concentrado puede reducir la proporción de energía dietética convertida en CH₄ (Blaxter y Clapperton, 1965), principalmente debido al cambio en el tipo de sustrato fermentado (fibra a almidón) y sus efectos sobre la fermentación ruminal, como una mayor tasa de fermentación, un cambio en el perfil de AGV y una disminución del pH ruminal (Beauchemin *et al.*, 2008). La suplementación de alimentos concentrados para animales en pastoreo no necesariamente aumenta el consumo total de MO (CMO; Moore, 1980). Este último depende de las características del pasto (estructura y edad del pasto), fuente y nivel de suplemento, y requerimientos de los animales (Poppi *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2020). En estudios con ganado de carne, siempre que no haya restricciones en la asignación de forraje, se espera que el suministro de suplementos concentrados con dietas basadas en forrajes de alta calidad bajo condiciones de manejo de pastoreo adecuadas tenga poco o ningún efecto sobre el CMO total, por otro lado, es más probable que la suplementación con concentrados para dietas basadas en forrajes de baja calidad resulte en un aumento en el CMO total (es decir, efectos aditivos o asociativos), lo que conduce a una mitigación de las emisiones de CH₄ entérico por unidad de producto animal (Moore, 1980). Según Paterson *et al.* (1994) una estrategia de suplementación adecuada debe enfocarse en maximizar el consumo y la digestibilidad del forraje disponible mientras se minimiza la suplementación/importación de concentrado al sistema de producción. Este enfoque minimiza los costos y está en consonancia con los principios de desarrollo sostenible (Beauchemin *et al.*, 2008). Sin embargo, las opciones de suplementos de concentrados deben analizarse en cuanto a su factibilidad a nivel local y en las dietas. Además, los ingredientes de subproductos que no son comestibles para los humanos pueden ser una buena alternativa.

Adición de lípidos en la dieta

Diversos estudios han señalado que la adición de lípidos en la dieta tiene un efecto de mitigación sobre las emisiones de CH₄ entérico (Beauchemin *et al.*, 2008; Grainger y Beauchemin, 2011; Hristov *et al.*, 2013b; Knapp *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2016). Esta práctica de mitigación

disminuye las emisiones de CH₄ a través de diversas vías, como lo son: cambiar la fermentación del rumen para promover la producción de propionato, el aumento en la producción de ácido propiónico, inhibición de protozoarios y metanógenos en el rumen y la hidrogenación de ácidos grasos insaturados (AGI; Johnson y Johnson, 1995; Bonilla y Lemus *et al.*, 2012, e Silva *et al.*, 2017). Estos efectos se han observado cuando se han usado AGI de cadena larga (C18) es decir, aceites vegetales y de pescado; oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) y ácidos grasos de cadena media (Patra, 2013; Yanza *et al.*, 2021).

La efectividad de la adición de lípidos en la dieta, para reducir las emisiones de metano, depende de diversos factores incluyendo el nivel de suplementación, fuente de grasa, perfil de ácidos grasos, forma en la cual la grasa es administrada y el tipo de dieta (Patra, 2013). Diversas investigaciones se han enfocado en la adición de aceites de oleaginosas para evaluar el efecto de mitigación de CH₄ en los animales. En el Cuadro 1 se muestra el perfil de ácidos grasos (en g/100 g del total de ácidos grasos) de aceite de oleaginosas frecuentemente utilizados.

Cuadro 1. Composición de ácidos grasos (en g/100 g del total de ácidos grasos) de aceites de semillas oleaginosas.

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Linaza	0.1	6.1	0.1	3.4	18.8	16.3	54.4
Canola	0.2	4.8	0.3	2.1	60.5	20.8	9.2
Soya	0.1	11.4	0.1	4.1	22.3	53.5	7
girasol	0.1	5.1	0.1	4.3	21.6	66.8	0.2

C14:0, mirístico; C16:0, palmítico; C16:1, palmitoleico; C18:0, esteárico; C18:1, oleico; C18:2, linoleico; C18:3, linolénico. (Glasser *et al.*, 2008).

Rabiee *et al.*, 2012 mencionan que la adición de lípidos en la dieta es una estrategia de mitigación efectiva que puede reducir todos los parámetros de CH₄ entérico con solo una pequeña disminución en el CMS que no afectó el promedio de producción de leche o GDP, lo que sugiere una mayor eficiencia alimenticia. Aunque la aplicación de esta práctica dependerá de los costos, efectos en el consumo, así como la eficiencia en la producción (Gerber *et al.*, 2013).

Beauchemin *et al.* (2008) estimaron que, por cada unidad porcentual de adición de lípidos en la MS en la dieta, las emisiones de CH₄ entérico se pueden reducir 5.6%. Por su parte, Giger-Reverdin *et al.* (2003) y Eugène *et al.* (2008) estimaron una disminución del 2.3% en las emisiones de CH₄ por unidad porcentual de adición de lípidos. Aunque Eugène *et al.* (2008) no encontraron ninguna disminución en CH₄ cuando se corrigió por el consumo (g/kg CMS), lo que podría indicar que la reducción de CH₄ en esos estudios fue el resultado de una reducción en el CMS de las vacas

alimentadas con dietas con lípidos adicionados en la dieta. Piñares-Patiño *et al.* (2016) suplementaron AC en novillos en pastoreo (46 g/kg AC) rociado sobre pradera de *Lolium perenne*, y reportan una disminución ($P < 0.05$) cuando se comparó con el tratamiento sin AC, tanto en producción (156.1 a 138.6 g/d) como en el rendimiento de CH_4 (20.9 a 17.2 g/kg de CMS), igual que una disminución ($P < 0.05$) en la proporción acetato:propionato (5.1 a 4.2) y un incremento en el CMS ($P < 0.05$) de 7.51 a 8.29 kg/d cuando rociaron AC.

El aceite de girasol se ha empleado como una opción para disminuir la producción de CH_4 ruminal, este aceite se caracteriza por tener un contenido elevado de ácidos insaturados, en particular el ácido linoleico (18:2 Δ 9,12) (Pal *et al.*, 2015). e Silva *et al.* (2017) demostraron que la inclusión de aceite de girasol en la alimentación de vacas ocasiona una disminución en la producción de metano sin alterar el consumo de alimento y producción de leche. El ácido oleico (18:1 Δ 9) también se ha evaluado como una posible alternativa para disminuir la emisión de CH_4 , en un estudio *in vitro*, líquido ruminal obtenido de cabras se suplementó ácido oleico a diferentes concentraciones y se observó que la suplementación disminuyó la producción de CH_4 e incrementó el contenido de AG benéficos como el ácido linoleico conjugado (ALC) (Wu *et al.*, 2016). Agueda *et al.* (2009) menciona que el ALC se refiere al grupo de isómeros del ácido linoleico (C18:2) que tienen dobles enlaces conjugados en diferentes posiciones y conformaciones, los isómeros cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12 son los que presentan actividad biológica. De igual forma se ha demostrado que al incluir una mezcla de aceite de canola con aceite de palma (80:20) en la alimentación de cabras (4 y 8 g/kg MS) no afectó el crecimiento, consumo de alimento y digestibilidad; pero sí disminuyó la emisión de CH_4 (Adeyemi *et al.*, 2016). Beauchemin *et al.* (2020) señalaron que se debe examinar la rentabilidad de esta práctica de mitigación, así como los posibles efectos negativos sobre la digestibilidad de la fibra y la calidad del producto como lo podría ser la depresión de la grasa y la proteína de la leche. En una revisión detallada, Hristov *et al.* (2013b) concluyeron que existe un potencial de mitigación real en la inclusión de lípidos en las dietas de rumiantes, pero resaltaron que, en tasas de inclusión altas (más del 8%), puede deprimir el CMS y la digestibilidad y, en consecuencia, la productividad animal. Estos autores indicaron además que las fuentes de lípidos como los granos secos de destilería y la semilla de algodón entera podrían aumentar la ingesta de N en la dieta, lo que puede conducir a un mayor potencial de emisiones de N_2O del estiércol durante el almacenamiento y la aplicación al suelo, lo que sugiere el potencial de un efecto de intercambio de contaminación.

Se ha informado de una reducción del 23 % en las emisiones de CH₄ en vacas lecheras (Holstein × Gyr) que pastaron *Urochloa* sp. Y suplementadas con 2.86 kg/d de concentrado y 0.73 g de aceite/kg de PV de aceite de girasol (e Silva *et al.*, 2017), sin embargo, en este trabajo, los autores no consideraron variables de fermentación ruminal para explicar sus resultados. Es importante señalar que, la suplementación con aceite en niveles altos (arriba del 5% de inclusión) en ganado en pastoreo debe usarse con cautela debido a los posibles efectos negativos sobre la digestibilidad de la fibra en el rumen (Jenkins y Palmquist, 1984), la baja digestibilidad intestinal y el valor energético de los lípidos (Zinn y Jorquera, 2007). En bovinos de carne, la digestibilidad óptima de los AG se limita a un consumo máximo de lípidos de 0.96 g/kg de peso vivo (PV), lo que representa un valor adecuado de energía en grasa (Zinn y Jorquera, 2007). Sin embargo, otros estudios han observado efectos similares sobre el CH₄ a niveles más bajos de suplementación con aceites (aproximadamente 0.73 g/kg PV; e Silva *et al.*, 2017). Con base a lo anterior se plantea la siguiente justificación.

3 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los experimentos donde se evalúan los efectos de la adición de aceite en la dieta de bovinos, se han desarrollado bajo condiciones de clima templado, con escasos informes para bovinos bajo condiciones de pastoreo tropical, donde los pastos tienen una baja concentración de FDNd, nitrógeno (N) y energía. Esto último tiene un efecto negativo en la eficiencia de utilización de N y la retención de carbono, provocando un aumento en la producción de CH₄ entérico de bovinos alimentados bajo sistemas de pastoreo en climas tropicales.

Para reducir las emisiones de CH₄ entérico en estos sistemas, una estrategia de mitigación de GEI podría ser el uso de alimentos concentrados, adicionado con cantidades adecuadas de aceite vegetal para aumentar la ingesta de energía, con un impacto nulo o mínimo sobre la FDNd. En consecuencia, es necesario determinar el nivel óptimo de inclusión de aceite vegetal para reducir las emisiones de CH₄ sin disminuir el CMS con un uso eficiente de la energía dietética en bovinos que pastorean en condiciones tropicales. En este contexto, se plantean las siguientes hipótesis y objetivos.

4 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL:

La inclusión de aceite de canola en un nivel óptimo en la dieta de vacas F1 (*Bos Taurus* × *Bos indicus*) mantenidas en condiciones tropicales en pastoreo y recibiendo una cantidad fija de concentrado, disminuye las emisiones de CH₄ entérico, sin disminuir el CMS, digestión de nutrientes, la fermentación y población microbiana en rumen.

Hipótesis específicas

- Al aumentar la adición de aceite de canola en la dieta, disminuyen las emisiones CH₄ liberado por el eructo en bovinos en condiciones de pastoreo en el trópico.
- Hay un nivel óptimo de aceite de canola, que reduce las emisiones de CH₄ sin afectar el consumo y digestibilidad de nutrientes en bovinos en condiciones de pastoreo en el trópico.
- Hay un nivel óptimo de aceite de canola de aceite de canola en la dieta, en donde se reducen las emisiones de CH₄ sin afectar la fermentación y la población de microorganismos ruminales.

5 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de aceite de canola, para establecer un nivel óptimo en la dieta de vacas F1 (*Bos Taurus* × *Bos indicus*) mantenidas en condiciones tropicales en pastoreo y recibiendo una cantidad fija de concentrado, en las emisiones de CH₄ entérico, CMS, la fermentación, digestión de nutrientes y población microbiana en rumen.

Objetivos específicos

- Evaluar las emisiones de CH₄ liberado por el eructo y la respiración en bovinos en condiciones de pastoreo en el trópico mediante un sensor infrarrojo.
- Evaluar el consumo y digestibilidad de nutrientes en bovinos en condiciones de pastoreo en el trópico por medio de un marcador externo (Cr₃O₂).
- Evaluar las variables de fermentación ruminal (pH, AGV, N-NH₃), población de protozoos y la microbiota ruminal.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

Los protocolos utilizados en este estudio fueron revisados y aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, DC-2018/2-1).

6.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), de la FMVZ, perteneciente a la UNAM, ubicado en Tlapacoyan, Veracruz, México (20 03'N y 93 03'W). El clima es cálido húmedo, Af (m) w"(e) (García, 2004), con una temperatura media diaria de $23.9 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y una precipitación media anual de 1.931 ± 334 mm.

6.2 Animales, alimentación y diseño experimental.

Se utilizaron cuatro vacas F1 (*B. taurus* × *B. indicus*) adultas canuladas en el rumen, no gestantes ni lactantes y con un peso vivo mermado promedio (PVM) de 631 ± 88 kg, este se obtuvo pesando a las vacas en tres días consecutivos a las 1100 h y posteriormente, el PV se multiplicó por el factor 0.96 para descontar el contenido intestinal (NASEM, 2016; Cannas *et al.*, 2004; Estrada-Angulo *et al.*, 2018; Rivera-Villegas *et al.*, 2019).

Las vacas se mantuvieron en pastoreo en un potrero con *Urochloa* sp., dividido en cuatro secciones de pasto de 50×50 m. El sistema de alimentación consistió en un pastoreo rotativo de 7 días por sección, con un período de recuperación de 21 días, para asegurar una altura promedio del pasto de 40 cm antes del pastoreo y 10 cm de residual, tomando en cuenta 40 puntos aleatorios por división antes y después del pastoreo, utilizando una regla graduada (Barthram, 1984).

Para la adición del concentrado (Purina®, Puricarne sequia) se consideró el 1% del PVM, el promedio de %MS en el concentrado utilizado durante el experimento fue de $89.07 \pm 0.7\%$, por lo que se ofrecieron 6.23 kg MS/animal de concentrado en promedio. El concentrado se mezcló con aceite de canola (Cristal® 99%, Aceites, Grasas y Derivados, S.A., Jalisco, México) a razón de 0, 249, 499 y 748 g promedio según el tratamiento asignado, lo que corresponde a 0.0, 0.40, 0.80 y 1.20 g AC/kg PVM, respectivamente (Zinn y Jorquera 2007; Bayat *et al.*, 2018). La mezcla (concentrado + AC) se ofreció dividida en partes iguales (50:50) a las 0600 y 1500 h directo en el comedero, por lo que los animales se trasladaban diariamente al corral de manejo donde se les

ofrecía la mezcla. En caso de que los animales no consumieran el total de la mezcla ofrecida, el residual de la mezcla se introdujo directamente en el rumen a través de la cánula ruminal, esto para asegurar la inclusión esperada de AC.

El diseño del experimento fue un Cuadrado Latino, con cuatro periodos para cuatro tratamientos; donde cada periodo tuvo una duración de 19 días, 11 de adaptación gradual a la dieta y 8 para la toma de muestras, durante los primeros 6 días se tomaron las muestras de CH₄ y heces (solo 4 días) dejando los últimos 2 días exclusivamente para la toma de muestras de líquido ruminal.

6.3 Muestreo

Alimento

Las muestras de forraje se recolectaron manualmente utilizando la técnica de “*hand-plucking*” (según lo descrito por Cook, 1964) cada siete días, cuando los animales cambiaron de división; Las muestras se pesaron en fresco y se colocaron en una estufa de aire forzado a 65° C hasta peso constante; Una vez secas, las muestras se almacenaron hasta su análisis en el laboratorio.

Las muestras de concentrado y forraje se secaron (60° C durante 72 h), se molieron y se tamizaron (1 mm) para un análisis de composición adicional. Las muestras de AC se almacenaron protegidas de la luz (botellas ámbar) y en condiciones frescas (18° C) hasta su análisis. Durante los periodos de muestreo, los animales no se encontraron pastando en una sola división del potrero, por lo que se hicieron mezclas de los pastos de cada división según el porcentaje de tiempo que estuvieron dentro de cada división, esto para tener muestras representativas.

Para determinar el consumo de forraje, a las vacas se pesaron 10 g de Cr₂O₃ (68.52 % de pureza) en un sobre de papel de celulosa y se colocaron directamente en rumen a través de la cánula, este proceso se realizó cada periodo los días 8 al 17 a las 1530 h. Para evaluar la digestibilidad de los nutrientes, se recolectaron aproximadamente 200 g de heces directamente del recto cada ocho horas de manera escalonada durante tres días consecutivos, d1: 00:00, 08:00 y 16:00; d2: 02:00 10:00 y 18:00; d3: 04:00, 12:00 y 20:00; d4: 06:00, 14:00 y 22:00 h. los cuales correspondieron con los días 14 al 17 de cada período. Las muestras fecales mantuvieron en refrigeraron (1-4° C) y al final de cada período de muestreo se homogenizaron por tratamiento para generar una muestra compuesta de 400 g que se mantuvo en congeló (-18° C) hasta su posterior análisis.

Contenido Ruminal

Se recolectaron muestras de contenido ruminal con ayuda de una bomba de vacío, (aproximadamente 200 mL) directamente de la cánula ruminal en los días 18 y 19 de cada período experimental cada 4 h (300, 700, 1100, 1500, 1900 y 2300 h). El contenido ruminal se filtró a través de ocho capas de gasa y se colocó en un vaso de precipitado donde se les midió el pH con un potenciómetro portátil (marca Oakton, pHTestrs®) y se distribuyó para las siguientes determinaciones:

Para estimar la población de protozoos, a cinco mL del contenido ruminal filtrado se agregaron cinco mL de solución de Lugol (preparación de la solución de Lugol: 1.5 g de yodo de potasio, 0.5 g de yodo resublimado y agua destilada hasta aforar a 100 mL) en un vial de 15 mL de capacidad, con tapón de plástico y tapa roscable. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 1 - 4° C hasta su análisis. El conteo de protozoos se hizo por sextuplicado, al microscopio (Carl Zeiss Axiolab E re, Artisan Technology Group, Champaign, IL, EE. UU.) en cámara Neubauer® (Marienfeld, Alemania).

Para determinar nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y del perfil de AGV se tomaron 40 mL correspondientes a 4 h post-alimentación (es decir, 1900h concentrado y 0300h forraje) en bolsas estériles de polietileno combinado super resistentete Whirl-Pac® de 60 mL, a cada muestra se le adicionaron 10 mL de ácido metafosfórico al 25% (v/v) para conservar las muestras, las cuales se mantuvieron en congelaron (-18° C) hasta su análisis.

Para la extracción de ADN se tomaron 8 mL cada 4 horas por día y se colocaron en tubos de polipropileno para centrifuga Corning® de 50 mL, las muestras se mantuvieron en congelación (-18° C) y al terminar cada periodo, las muestras se trasladaron a un ultracongelador (-40° C) en el laboratorio de microbiología ruminal del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica donde se resguardaron hasta su uso.

6.4 Estimación de emisiones de metano

El CH₄ se midió utilizando el método “*Sniffer*” según Garnsworthy *et al.* (2012). Las concentraciones de CH₄ se midieron cuando se ofrecía el concentrado en el comedero (adaptado para evitar corrientes de aire y con un volumen conocido) a las 0600 y 1500 h utilizando un analizador de CH₄ infrarrojo (0-10 ppm; Guardian Plus; Edinburgh Instruments Ltd., Livingston,

Reino Unido). Cada que un animal entraba al comedero se registraba la hora de entrada, así como el equipo que estaba conectado a dicho comedero, las lecturas duraban el periodo de tiempo en el que el animal consumía el concentrado, la hora de salida se registraba cuando el animal terminaba de comer el concentrado ofrecido o sacaba la cabeza de manera definitiva.

Para conectar una línea de muestreo entre el comedero y el analizador infrarrojo, se colocó una manguera de poliuretano (6 mm de diámetro interno) a través del comedero a la altura del morro de las vacas y, con la misma manguera, se armó un anillo (10 cm de diámetro) dentro del comedero con múltiples perforaciones para extraer los gases de la respiración y eructos del animal. Con ayuda de una bomba dentro de los equipos, la muestra se transportó hacia el analizador infrarrojo donde la concentración de CH₄ se registró (expresado como mA) cada segundo en un registrador de datos (Simex SRD-99; Simex Sp. z o.o., Gdansk, Polonia). Los datos del registrador se extraían automáticamente al colocar una USB, estos datos se visualizan en una PC utilizando un software de registro (Loggy Soft; Simex Sp. z o.o.) donde los datos se transformaron en valores de cada pico (concentración de CH₄ máxima menos la inicial para cada eructo) y el área bajo la curva para cada pico (que representa la liberación total de CH₄ por eructo) en el tiempo en el que el animal permeancia con la cabeza dentro del comedero.

Para cada entrada al comedero, se calcularon la altura media del pico y el área bajo la curva, junto con la frecuencia del pico (tasa de eructos). Se calculó una tasa de emisión de CH₄ (*MER*, por sus siglas en inglés) durante la alimentación de concentrado (es decir, la entrada al comedero) como el producto de la frecuencia máxima y el área media máxima. Las estimaciones de emisión de CH₄ se calcularon como el promedio de 12 eventos de muestreo, es decir, 6 días de muestreo con dos muestreos diarios a las 0600 y 1500 h (en los comederos adaptados donde se ofrecía la mezcla). La emisión de CH₄ se expresó como producción total utilizando la siguiente fórmula: $\text{g CH}_4/\text{d} = 252 + 57.2 \text{ MER}$ (Garnsworthy *et al.*, 2012). Ya con el valor de la producción de CH₄, se obtiene el rendimiento de CH₄, g/kg CMS y g/kg de FDNd.

El factor de conversión de CH₄ (medida en que la energía de alimentación se convierte en CH₄, Y_m) se calculó de acuerdo con el Nivel 2 del IPCC (2006), la conversión de energía de CH₄ a flujo en unidades de masa fue de 55.56 MJ/kg (Lassey, 2007). Como se muestra a continuación:

$$Y_m = \frac{\frac{(\sum_{i=1}^n CH_{4i})}{n}}{\frac{(\sum_{i=1}^n CEB_i)}{n}} \times 100$$

Donde Y_m, factor de conversión de CH₄ (% de CEB); CH_{4i}, las i-ésimas emisiones observadas de energía de CH₄ (MJ/d); CEB_i, la i-ésima Consumo de Energía Bruta observado (MJ/d); y n, número de observaciones (Kaewpila y Sommart, 2016). Los promedios utilizados para el cálculo son los obtenidos en el experimento. Se multiplicaron la Mcal por 4.182 para obtener MJ.

6.5 Análisis de muestras

Se analizaron los ingredientes del alimento (AC, *Urochloa* sp. y concentrado) y muestras de forraje residual para contenido de MS (método 934.01; AOAC, 2015), proteína cruda (PC, método 2001.11; AOAC, 2015), ceniza (Cen, método 942.05; AOAC, 2015), fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA), tal y como describen Van Soest *et al.* (1991), usando alfa-amilasa sin corrección por cenizas y un analizador ANKOM 2000, Gross Energy usando el enfoque de bomba calorimétrica (Parr, 6400; Illinois, EE. UU.).

El CMS se estimó según Schneider y Flatt (1975), considerando el consumo y pureza del Cr₂O₃ y el Cr₂O₃ en la materia fecal, una vez estimando el CMS total, se restó el consumo del concentrado y del aceite para estimar, por diferencia, el consumo del pasto. La digestibilidad de *Urochloa* sp. y las muestras de concentrado se determinaron mediante una prueba *in vitro* previamente realizada (Goering y Van Soest, 1970).

La producción total de heces se estimó con el Cr₂O₃ (Oliveira *et al.*, 2007), para obtener la producción de heces asociada al, se descontó la producción fecal asociada con el concentrado y el aceite de canola de la producción fecal total. El Cr₂O₃ se determinó por espectrometría de absorción atómica (Genesys 10S UV Vis, Thermo Scientific) siguiendo la metodología descrita por Williams *et al.* (1962).

El contenido de N-NH₃ se determinó espectrofotometría, de acuerdo al método fenol-hipoclorito propuesto por Conway y O'Malley (1942). Las muestras de contenido ruminal se

descongelaron y se centrifugaron (Sorvall Biofuge Primor R, Thermo Scientific) a 3 500g por 25 minutos a 4°C, posteriormente el sobrenadante se transfirió a frascos ámbar. Se realizó una curva estándar de sulfato de amonio, de concentraciones de 2.5-20 mg/dL. Para la determinación, en tubos de ensayo de 13x100 mm se adicionó 1mL de solución de fenol (168µM nitroprusida de sodio (Sigma-Aldrich) y 106 mM de fenol (J.T Baker), posteriormente se agregaron 20µL de la muestra o de la curva estándar se mezcló en vortex y a continuación se adicionó 1mL de hipoclorito de sodio (187 mM de hidróxido de sodio, Sigma-Aldrich), 150mM de fosfato de sodio dibásico (Merck) y 0.75% hipoclorito comercial (Mayer) se mezcló con ayuda de un vortex y los tubos se incubaron a 37° C por 30 min, pasado ese tiempo se agregaron 5mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV Vis, Thermo Scientific).

El perfil de AGV se midió por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961) con un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo AutoSystem XL, utilizando una columna capilar CP-7420 Select de 100 m × 0.2 mm × 0.25 µm FAME (Agilent Technologis). Para realizar la metilación de los AG se utilizó la metodología AOAC (2019). Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes: acarreo 1.5 mL/min; temperatura, 80° C; temperatura del inyector, 220° C; temperatura del detector: 275–280° C; Las condiciones fueron las siguientes: 80° C (1 min), 20° C/min, 160° C, 1°C/min, 198° C, 5°C/min 250°C (15 min). El análisis cromatográfico se realizó con el estándar Supelco TM 37 Component FAME MIX, número de catálogo 47885-U.

6.6 Extracción de ADN

Las muestras de fluido ruminal se centrifugaron a 1 1309 rpm durante 10 min (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 300 µL de PBS (amortiguador fosfato salino) 1x e inmediatamente se centrifugó a 1 599 rpm durante 5 min. El sobrenadante, denominado sedimento bacteriano, se utilizó para la extracción de ADN (Vaidya *et al.*, 2018).

La extracción de ADN se realizó mediante una modificación de la técnica reportada por Wilson (2001). Se centrifugaron 500 µL de sedimento bacteriano a 5 000 rpm durante 10 min. (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania), se descartó el sobrenadante. El sedimento se homogeneizó con 567 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, Sigma-Aldrich, EDTA 1 mM, pH 8, J.T. Baker). Posteriormente se agregaron 50 µL de lisozima (10 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente, se añadieron 30 µL de SDS (10%,

Bio-Rad) y 4 μL de proteinasa K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubó a 56°C durante 60 min. Después se añadieron 100 μL de NaCl (5M IBI SCIENTIFIC) a cada muestra seguido de 100 μL de CTAB/NaCl (10% CTAB N-cetyl N, N, N, - bromuro de trimetil amonio, Sigma-Aldrich, 0.7M NaCl, IBI SCIENTIFIC) y se incubó a 65°C durante 10 min. Después de la incubación se añadieron 80 μL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml, se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, Sigma-Aldrich) y las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL, mezclado con 200 μL de cloroformo (Sigma-Aldrich) e incubado por 10 min a temperatura ambiente; Posteriormente se realizó una centrifugación a 14 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recogió y se mezcló con un volumen de isopropanol frío (BDH) y se incubó durante la noche a -20°C . Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min, se decantó isopropanol y los ácidos nucleicos se lavaron con 300 μL de etanol (70%, Sigma-Aldrich). Se realizó un paso final de centrifugación a 10 000 rpm durante 5 min y se decantó el etanol. El ADN se resuspendió en 100 μL de agua grado Biología Molecular (Corning) y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

6.7 Perfil de microbiota ruminal

Para el análisis del rRNA 16s se utilizó la plataforma Miseq de Illumina. Se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S utilizando cebadores para estas regiones que también contenían un adaptador "superior":

(F:5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' y

R:5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron por reacciones de PCR con un volumen total de 25 μL , de los cuales 2.5 μL fueron de ADN genómico (5 ng/ μL en 10 mM Tris pH 8.5), 12.5 μL de ADN polimerasa de alta fidelidad 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 μL de cada cebador (1 μM). Esta mezcla se incubó en el termociclador con el siguiente programa: 3 min a 95°C , seguido de 25 ciclos de amplificación que consistieron en desnaturalización (30 s a 95°C), alineamiento (30 s a 55°C) y extensión (30 s a 95°C). La extensión final consistió en 5 min a 72°C . Los amplicones se purificaron utilizando perlas magnéticas AMPure XP beads y se verificó su tamaño en una electroforesis capilar en el Qiaxcel, el tamaño aproximado fue de 550

pares de bases (pb), una vez obtenidas estas características, las muestras se indexaron con los adaptadores del kit de indexación Nextera XT de Illumina (v.2, conjunto A). Para este proceso, se tomaron 5 µL del primer producto de PCR, 25 µL de ADN polimerasa de alta fidelidad 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 µL de cada cebador (Índice), teniendo un volumen total de 50 µL, se mezclaron y se incubaron nuevamente en termociclador, ejecutando lo siguiente programa 3 min a 95° C, seguido de 8 ciclos de amplificación que consistieron en desnaturalización (30s a 95° C), alineamiento (30s a 55° C) y extensión (30s a 72° C). La extensión final consistió en 5 min a 72° C. Este producto se purificó y analizó su integridad como antes, estos amplicones tenían un tamaño aproximado de 610 pb.

La concentración de ADN de doble cadena se determinó con fluorometría (fluorómetro Qubit 3.0, kit de alta sensibilidad). La biblioteca final se mezcló de forma equimolar y se secuenció en la plataforma Illumina MiSeq (MiSeq Reagent Kit V.3, 600 ciclos) siguiendo las instrucciones del proveedor, generando lecturas de 300 bases en cada dirección. Finalmente, los datos obtenidos se analizaron mediante QIIME (Sánchez-Tapia *et al.*, 2017).

6.8 Análisis bioinformático de microbiota ruminal

Para el análisis de la composición taxonómica de la microbiota ruminal, se utilizaron secuencias de comandos Custom C# y python en la canalización de software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) v2.0 para procesar los archivos de secuenciación. Los resultados de la secuencia se filtraron en busca de secuencias de baja calidad (definidas como secuencias de <300 pb o >620 pb, secuencias con discrepancias de nucleótidos con el código de barras o el cebador, secuencias con una puntuación de calidad promedio de <30 y secuencias con bases ambiguas >0). Se comprobaron las secuencias en busca de quimeras y se eliminaron las secuencias quiméricas. El análisis comenzó agrupando secuencias dentro de un porcentaje de similitud de secuencia en unidades taxonómicas operativas (por sus siglas en ingles OTU, *operational taxonomic units*). El noventa y dos por ciento de las secuencias pasaron el filtrado, lo que resultó en $78\,110 \pm 23\,947$ secuencias/muestra en promedio con un umbral de similitud del 97 %. Las OTU se seleccionaron de la base de datos RDP. El noventa y siete por ciento de las OTU se seleccionaron de la base de datos. Después de fusionar los archivos OTU resultantes en una tabla general, la taxonomía se asignó en función de la base de datos de taxonomía de referencia. Así, el 99.7 %, 99.7 %, 99.2 %, 92.1 % y 84.82 % de las lecturas se asignaron al nivel de filo, clase, orden,

familia y género, respectivamente. Se calculó la diversidad alfa mediante el índice de Shannon y se estimó la diversidad dentro de la muestra a una profundidad de rarefacción de > 13 947 lecturas por muestra. Se utilizaron distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas para realizar el análisis de componentes principales (ACP). Los datos de secuencia microbiana se agruparon para la comparación de OTU y el análisis de abundancia taxonómica, pero se separaron por lotes en ACP para tener cifras claras de ACP. Los ACP se crearon con Emperor, y la diversidad de la comunidad se determinó por la cantidad de OTU y la diversidad beta, medida por la distancia ponderada y no ponderada de UniFrac (Sánchez-Tapia *et al.*, 2017).

6.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron como un Diseño de Cuadrado Latino 4×4 , utilizando el procedimiento proc MIXED de SAS 9.0 (Statistical Analysis System, Inc., Cary, NC, EE. UU.), de acuerdo con el siguiente modelo: $Y_{ij} = \mu + H_i + C_j + T_k + \varepsilon_{ij}$, donde Y_{ijk} es la variable dependiente, μ es la media general, H_i es el efecto del i -ésimo animal (fila), C_j es el efecto del j -ésimo período (columna), T_k es el efecto de la k -ésima suplementación de AC y ε_{ijk} es el efecto residual. Se utilizaron polinomios ortogonales para evaluar la respuesta al nivel de inclusión de AC como tendencias lineales y/o cuadráticas (Cochran y Cox, 1992).

Para los parámetros de fermentación ruminal (AGV, estimación del número de protozoos y emisión de CH_4), el período/tiempo de muestreo se incluyó como medida repetida; las diferencias con valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. La normalidad de la distribución y la homogeneidad de la varianza de los residuos se probaron utilizando el procedimiento univariado Proc de SAS 9.0.

El análisis de similitud (ANOSIM) y ACP de la composición de la comunidad bacteriana se realizaron utilizando el paquete vegan en el software R 4.0.3 de acuerdo con la guía de análisis estadístico en ecología microbiana (GUSTAME; Buttigieg y Ramette, 2014). La abundancia relativa de comunidades microbianas, a través de análisis de diversidad beta y alfa, se comparó utilizando un ANOVA unidireccional con la prueba post-hoc de Tukey ($p < 0.05$).

7 RESULTADOS

7.1 Alimento utilizado durante el experimento

Los resultados del análisis de composición química de AC, concentrado comercial y *Urochloa* sp. se muestran en el Cuadro 2. El AC suplementario representó 0.0, 1.97, 4.15 y 5.81% de inclusión del consumo total de MS (concentrado + forraje suplementado con AC) para tratamientos de 0.0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM, con una concentración de grasa total en la dieta de 2.66, 4.53, 6.67 y 8.30%, respectivamente.

Cuadro 2. Composición química de los ingredientes utilizados durante el experimento.

Elementos (g/100g de MS)	Aceite de canola	<i>Urochloa</i> sp.	Concentrado comercial
Proteína Bruta	-	6.4	19.5
Cenizas	-	11.1	13.7
Fibra Detergente Neutro	-	66.6	41.8
Fibra Detergente Ácido	-	41.4	14.6
Extracto Etéreo	99.0	2.26	3.0
Energía Bruta (Mcal/kg Materia Seca)	9.5	3.7	3.7

7.2 Consumo de materia seca y digestibilidad.

El efecto del AC sobre el consumo de alimento, la excreción fecal y la digestión total del tracto se muestra en la Cuadro 3. El CMS promedio del concentrado fue de 5 870 g/vaca/día, mientras que el consumo de AC promedio fue de 0, 249, 499 y 748 g/vaca/día. El CMS diario de forraje (*Urochloa* sp. en pastoreo) no se afectó por tratamientos con un promedio de 6 030 g/vaca/día. La ingesta del concentrado suplementado con AC fue comparable entre los tratamientos, y la ingesta de AC aumentó linealmente ($P < 0.01$) según el nivel de suplementación. Se observó que el CMS total aumentó a medida que la suplementación con AC aumentó de forma lineal ($P = 0.02$). No hubo efectos del tratamiento sobre la ingesta de MO o PB, pero la ingesta de FDN tendió ($P = 0.09$) a aumentar a medida que aumentaba el AC en la dieta. No hubo efectos del tratamiento sobre la digestión total del tracto MO, FDN o PB, pero la energía digestible (Mcal/kg) aumentó linealmente con la adición de AC.

Cuadro 3. Consumo de materia seca, excreción fecal y digestión total del tracto de vacas alimentadas con diferentes niveles de aceite de canola.

Elemento	Aceite de canola g/kg PVM ¹				EEM ²	Valor de P ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	C
<i>Consumo⁴</i>							
Concentrado, kg/d	6.23	5.99	5.74	5.49	0.10	0.02	0.77
Aceite de canola, kg/d	0	0.25	0.50	0.75	0.16	< 0.01	1.00
Conc. más aceite, kg/d	6.23	6.24	6.24	6.23	0.12	0.56	0.87
<i>Urochloa</i> sp., kg/d	5.34	6.37	5.78	6.62	0.29	0.11	0.81
CMS total, kg/d	11.6	12.6	12.0	12.9	0.42	0.02	0.81
MO, kg/d	10.3	11.2	10.7	11.4	0.25	0.11	0.76
FDN, kg/d	6.47	7.13	6.81	7.45	0.21	0.09	0.97
FDA, kg/d	3.26	3.68	3.44	3.85	0.13	0.11	0.98
PB, kg/d	1.56	1.58	1.49	1.54	0.02	0.75	0.22
EB, Mcal/d	45.0	52.0	52.0	57.0	2.51	< 0.01	0.78
<i>Excreción Fecal</i>							
MS, kg/d	4.19	4.39	4.20	4.36	0.16	0.02	0.81
MO, kg/d	3.39	3.44	3.41	3.50	0.04	< 0.01	0.13
FDN, kg/d	2.27	2.57	3.03	3.85	0.10	0.08	0.34
FDA, kg/d	1.94	2.08	1.86	2.30	0.06	0.22	0.41
PB, kg/d	0.46	0.49	0.45	0.49	0.01	0.17	0.82
EB, Mcal/d	16.4	18.9	19.3	21.1	0.84	< 0.01	0.78
<i>Digestión total del tracto</i>							
MS, %	63.8	65.2	65.1	66.1	0.47	0.22	0.51
MO, %	66.9	69.3	68.0	69.2	0.57	0.78	0.66
FDN, %	64.6	64.0	55.5	48.3	4.02	0.06	0.58
FDA, %	40.6	44.3	45.9	40.3	1.25	0.97	0.28
PB, %	70.3	68.6	69.5	68.5	0.42	0.34	0.74
ED, %	63.5	63.7	62.8	63.1	0.21	0.67	0.98
ED, Mcal/d	28.8	32.5	32.9	36.3	1.53	<0.01	0.85
ED, Mcal/kg	2.47	2.62	2.71	2.82	0.04	<0.01	0.75

¹PVM, peso vivo mermado, $PV \times 0.9$ (NASEM, 2016); ²EEM, error estándar de la media; ³Valor de P, L (lineal) y C (cuadrático); CMS, consumo de la materia seca; MS, materia seca; MO, materia orgánica; FDN, Fibra Detergente Neutro; FDA, fibra detergente ácida; PB, proteína bruta; EB, energía bruta; ED, energía digestible; Mcal, Mega calorías; ⁴El consumo se estimó en base a la producción fecal (utilizando Cr₂O₃ como marcador).

7.3 Fermentación ruminal

Los efectos de la suplementación con AC sobre el N-NH₃, el pH y los AGV se muestran en la Cuadro 4. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para N-NH₃ (≥ 0.27) y pH ruminal (≥ 0.78), al igual que para las concentraciones ruminales totales de AGV y los ácidos: butírico (≥ 0.76), iso-butírico (≥ 0.9), e iso-valérico (≥ 0.06). El ácido acético disminuyó linealmente ($P < 0.01$) en 4.2 % con la suplementación de 0.8 g AC/kg PVM, mientras que los ácidos propiónico y valérico aumentaron linealmente ($P < 0.01$) a 24.6 y 3.0 %, respectivamente, con la suplementación de 1.2 g AC/kg PVM en comparación con el control. En consecuencia, la

relación acetato: propionato disminuyó linealmente ($P < 0.01$) un 88.9, 80.9 y 74.2 % para los niveles de 0.40, 0.80 y 1.20 g AC/kg PVM, respectivamente.

Cuadro 4. Efecto de la inclusión de aceite de canola sobre el nitrógeno amoniacal del líquido ruminal, el pH, los ácidos grasos volátiles y el metano.

Elemento	Aceite de canola g/kg PVM ¹				EEM ²	Valor de P ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	C
N-NH ₃ , mg/dL	25.5	26.7	33.0	34.4	2.23	0.27	0.99
pH	6.49	6.50	6.47	6.48	0.01	0.78	0.99
<i>Ácidos grasos volátiles</i>							
AGVT, mM	77.5	74.5	74.3	70.7	1.39	0.18	0.92
Acético, mol/100mol	60.1	58.4	57.6	55.5	0.96	<0.01	0.73
Propiónico, mol/100mol	19.1	20.9	22.6	23.8	1.30	<0.01	0.50
Butírico, mol/100mol	11.8	11.7	10.8	11.1	0.24	0.76	0.36
Valérico, mol/100mol	3.32	3.33	3.44	3.42	0.03	<0.01	0.38
Iso-butírico, mol/100mol	2.60	2.58	2.51	2.68	0.04	0.90	0.41
Iso-valérico, mol/100mol	2.10	2.07	2.01	2.14	0.03	0.06	0.79
A:P ⁴	3.14	2.79	2.54	2.33	0.17	<0.01	0.47
<i>Emissiones de metano (infrarrojo)</i>							
MER, mg/min	0.92	0.85	0.82	0.49	0.10	0.01	0.25
CH ₄ , g/d	304.8	300.9	299.1	280.1	5.51	0.01	0.25
CH ₄ , g/kg CMS	26.3	23.9	24.9	21.7	0.98	0.01	0.65
CH ₄ , g/kg FDNd	72.6	66.0	79.1	77.8	1.99	0.74	0.44
CH ₄ , % CEB (Ym)	9.03	7.94	7.86	6.70	0.48	0.01	0.88

¹PVM, peso vivo mermado, $PV \times 0.9$ (NASEM, 2016); ²EEM, error estándar de la media; ³Valor de P, L (lineal) y C (cuadrático); ⁴A:P, relación de ácido acético con el ácido propiónico; N-NH₃, nitrógeno amoniacal; AGVT, ácidos grasos volátiles totales; MER, tasa de emisión de metano; CH₄, metano; CMS, consumo de la materia seca; FDNd, fibra detergente neutra digerida; CEB, Consumo de energía bruta. Ym= pérdida de energía de CH₄, en proporción al CEB.

7.4 Emisiones de metano

En el Cuadro 4 se muestran las emisiones entéricas de CH₄, en comparación con control, la tasa de emisión de CH₄ (MER) disminuyó linealmente (92.4, 89.1 y 53.3 %, $P < 0.05$) a medida que el nivel de AC en la dieta aumentó. Para CH₄ expresado en g/d, la disminución observada (efecto lineal, $P < 0.05$) fue 98.7, 98.1 y 91.9 %, mientras que para CH₄ descrito como g/kg CMS, la reducción (efecto lineal, $P < 0.01$) fue 90.9, 94.7 y 82.5 %. No se encontró diferencia estadística entre tratamientos en la producción de CH₄ por kilogramo de FDN digerido. Para el factor de conversión de metano Ym (CH₄, % CEB), se observó una disminución lineal ($P < 0.01$) de 87.9, 87 y 74.2 % a medida que aumentaba el nivel de AC.

7.5 Caracterización de la población ruminal microbiana

7.5.1 Población de protozoos

En el Cuadro 5, se muestra el efecto de la inclusión de aceite de canola sobre los protozoos, donde se observa que la población total de protozoos ruminales disminuye a medida que aumenta la suplementación con AC, reduciendo la población un 70.3, 30.5 y 11.4 % (efecto lineal, $P < 0.01$) para 0.4, 0.8 y 1.2 g AC/kg PVM, respectivamente. Esta reducción en la población (efecto lineal, $P < 0.01$) también se observó en *Entodinae* (68.6, 31.2 y 11.2 %) y *Holotrichidae* (88.8, 22.5 y 13 %, respectivamente) cuando se adiciona 0.4, 0.8 y 1.2 g AC/kg PVM respectivamente.

Cuadro 5. Efecto de la inclusión de aceite de canola sobre concentración protozoos.

Elemento	Aceite de canola g/kg PVM ¹				EEM ²	Valor de P ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	C
<i>Protozoa, x10⁴ cel/mL</i>							
<i>Entodinae</i>	1845	1265	575	207	364	<0.01	0.05
<i>Holotrichidae</i>	167	148	37	23	37	<0.01	0.79
Protozoos totales	2012	1413	612	230	401	<0.01	0.05

¹PVM, peso vivo mermado, $PV \times 0.9$ (NASEM, 2016); ²EEM, error estándar de la media; ³Valor de P, L (lineal) y C (cuadrático).

7.5.2 Resumen de datos de secuencia de ADN

De un total de 16 muestras se generaron 1 249 765 secuencias, con un promedio de 78 110 secuencias retenidas, la longitud promedio de las secuencias retenidas fue de 450 pares de bases. El número de OTU detectadas fue de 1 141.

7.5.3 Análisis de diversidad alfa

La diversidad alfa hace referencia a la diversidad que se encuentra en una sola población (diversidad dentro de la muestra). Las diferencias entre los tratamientos experimentales se determinaron mediante análisis de diversidad alfa. No hubo diferencias significativas en el Chao 1 ($P = 0.48$) y el índice de Shannon ($P = 0.67$) entre los tratamientos experimentales (Figura 4. A, B).

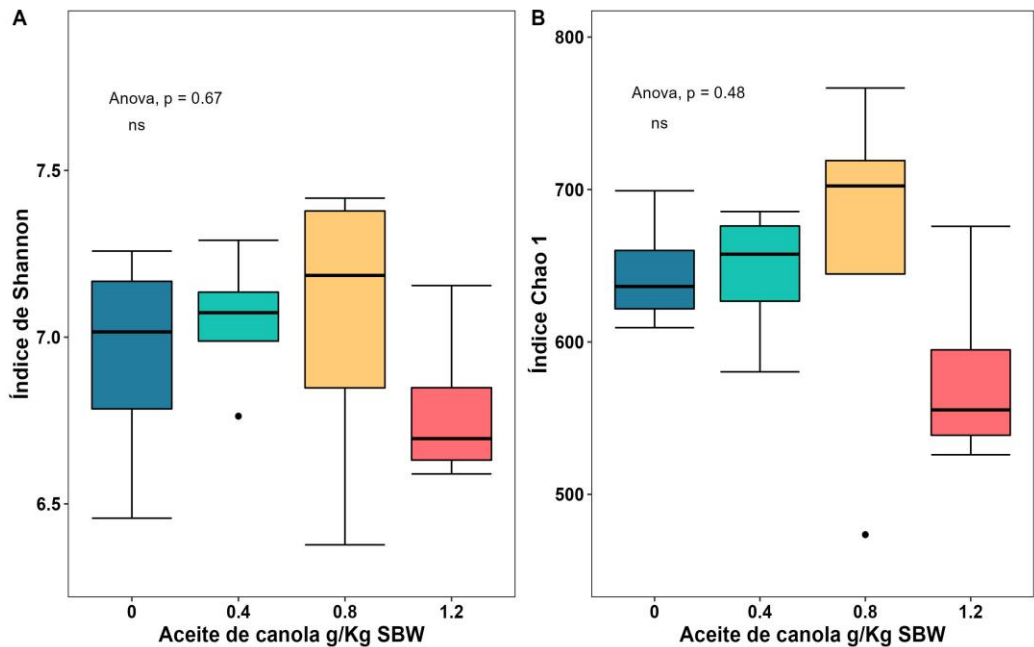


Figura 4. Diferencia en alfa diversidad con la inclusión de aceite de canola usando el (A) índice Shannon y (B) índice Chao1.

7.5.4 Análisis de diversidad beta

La diversidad beta expresa la similitud o diferencia entre poblaciones (entre muestras). Para evaluar la diversidad beta entre los grupos experimentales se realizó un análisis UniFrac de coordenadas principales (ACP) ponderado y no ponderado. El análisis UniFrac ponderado (Figura 5A) demostró que no hay diferencia en la abundancia de OTU detectadas y el análisis UniFrac no ponderado mostró (Figura 5B) que no hay diferencia en la presencia de OTU detectadas.

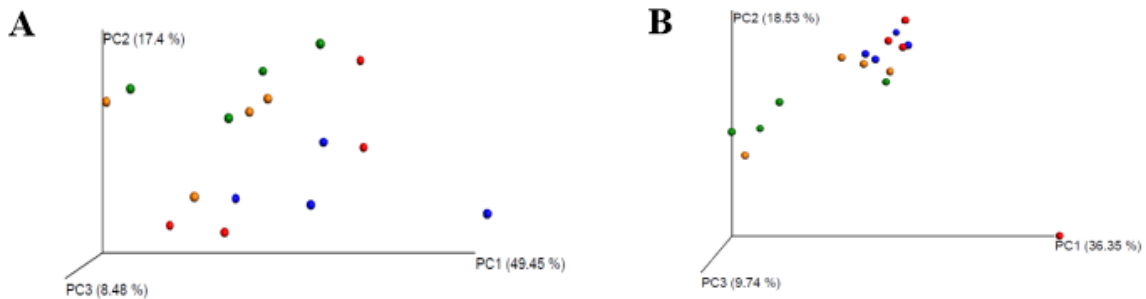


Figura 5. Diferencia en beta diversidad con el análisis UniFrac ponderado (A) y no ponderado (B) con la inclusión de aceite de canola.

7.5.5 Asignaciones taxonómicas

Los análisis ANOSIM ($r = 0.0746$, $P = 0.2075$) y ACP (Figura 6A) demostraron que no hubo diferencias significativas entre tratamientos en el nivel de filo. Se identificaron un total de 19 filos bacterianos, en el Cuadro 6 se muestran los que presentan una abundancia relativa superior al 0.1%.

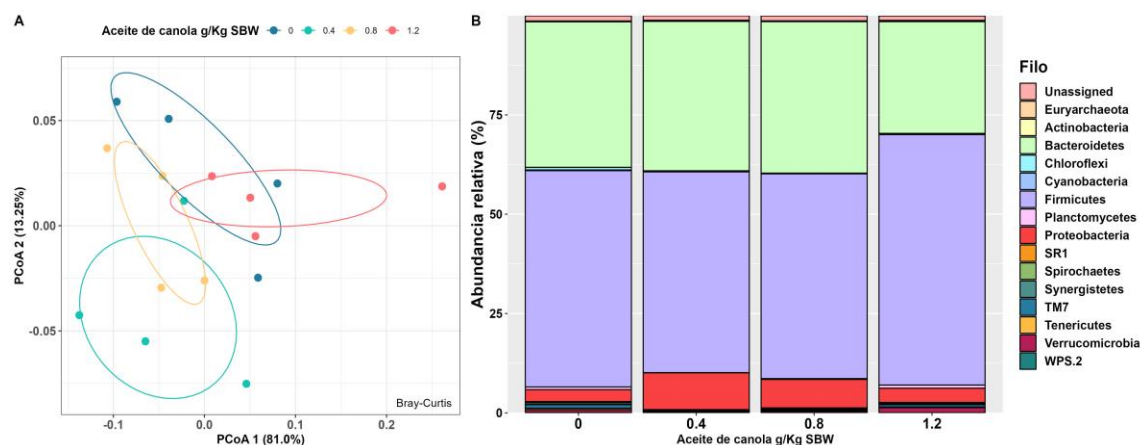


Figura 6. Diferencia en la composición de bacterias con la inclusión de aceite de canola a nivel de filo. (A) Análisis de componentes principales (ACP); (B) Abundancia relativa (%) de bacterias.

Cuadro 6. Abundancia relativa (%) de los principales filos bacterianos en vacas suplementadas con aceite de canola (0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM).

Filo	Aceite de canola g/kg PVM ¹				EEM ²	Valor de P ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	C
No asignado	1.31	1.18	1.33	1.14	0.05	0.47	0.75
<i>Euryarchaeota</i>	0.07	0.01	0.02	0.12	0.03	0.30	0.06
<i>Actinobacteria</i>	0.14	0.24	0.46	0.18	0.07	0.69	0.35
<i>Bacteroidetes</i>	36.63	37.63	36.63	28.14	2.22	0.20	0.11
<i>Chloroflexi</i>	0.65	0.00	0.02	0.17	0.15	0.17	0.10
<i>Cyanobacteria</i>	0.18	0.24	0.09	0.13	0.03	0.03	0.81
<i>Firmicutes</i>	54.42	50.52	50.38	63.03	2.97	0.14	0.05
<i>Planctomycetes</i>	0.68	0.05	0.2	0.78	0.18	0.42	<0.01
<i>Proteobacteria</i>	3.01	9.25	5.76	3.59	1.41	0.67	<0.01
SR1	0.27	0.02	0.04	0.11	0.06	0.64	0.38
<i>Spirochaetes</i>	0.39	0.17	0.35	0.17	0.06	0.51	0.02
<i>Synergistetes</i>	0.11	0.08	0.12	0.25	0.04	0.08	0.14
TM7	0.91	0.18	0.22	0.60	0.17	0.47	0.08
<i>Tenericutes</i>	0.37	0.18	0.16	0.15	0.05	0.01	0.03
<i>Verrucomicrobia</i>	0.71	0.15	0.32	1.28	0.25	0.15	0.03
WPS-2	0.10	0.05	0.11	0.04	0.02	0.48	0.85

¹PVM, peso vivo mermado, $PV \times 0.96$ (NASEM, 2016); ²EEM, error estándar de la media; ³Valor de P lineal (L) y cuadrático (C).

Los filos predominantes para el tratamiento sin adición de AC fueron *Firmicutes* (54.4 %) y *Bacteroidetes* (36.6 %) y *Proteobacteria* (3 %) donde, solo en este último se observó un incremento (efecto cuadrático, $P < 0.01$) del 207.3 % con la adición de 0.4 g AC/kg PVM para después disminuir 91.4 y 19.3 % con la adición de 0.8 y 1.2 g AC/kg PVM respectivamente.

Para los filos de menor abundancia (menos del 1%), la adición de AC provocó una disminución (efecto cuadrático, $P < 0.05$) de *Planctomycetes* en comparación con el grupo control del 92.6 y 70.6 % con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM respectivamente, y un aumento del 14.7 % con la adición de 1.2 g AC/kg PVM. La abundancia relativa de *Spirochaetes* mostró una disminución del 56.4 % (efecto cuadrático, $P < 0.05$) para los tratamientos con 0.4 y 1.2 g AC/kg PVM y una disminución mínima (10.3 %) con la adición de 0.80 g AC/kg PVM en comparación con el control. Para la abundancia relativa de *Tenericutes*, la adición de 0.40, 0.80 y 1.20 g AC/kg PVM, provocó una disminución (efecto lineal, $P < 0.05$) del 55, 54 y 53 % en comparación con el tratamiento control. La abundancia relativa de *Verrucomicrobia* disminuyó (efecto cuadrático, $P < 0.05$) en comparación al control en un 78.9 54.9 % con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM respectivamente y aumentó un 80.3 % con la adición de 1.2 g AC/kg PVM. La abundancia relativa de *Cyanobacteria* aumentó (efecto cuadrático, $P < 0.05$) 33.3 % con la adición 0.4 g AC/kg PVM y disminuyó en un 50 y 27 % con la adición de 0.8 y 1.2 g AC/kg PVM respectivamente.

En el caso de *Euryarchaeota*, y *Firmicutes* se observa una tendencia negativa (efecto cuadrático, $P = 0.056$ y $P = 0.05$, respectivamente) en los animales suplementados con 0.40 y 0.80 g AC/kg PVM y un aumento de 71.4 % para *Euryarchaeota* y 15.8 % para *Firmicutes* con la adición de 1.2 g AC/kg PVM.

En el análisis ANOSIM ($r = 0.224$, $P = 0.209$) y ACP (Figura 7A) a nivel de familia, se observa que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

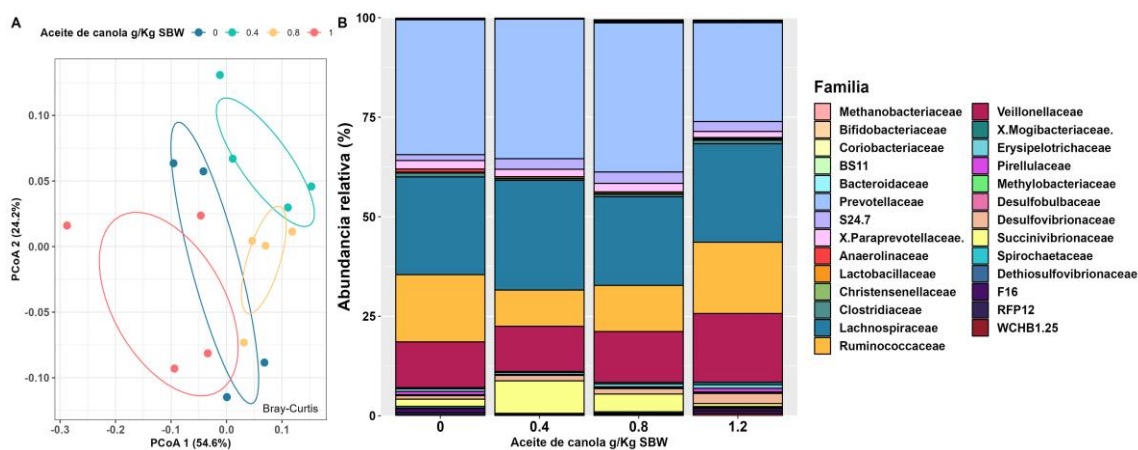


Figura 7. Diferencia en la composición de bacterias con la inclusión de aceite de canola a nivel de familia. (A) Análisis de componentes principales (ACP); (B) Abundancia relativa (%) de bacterias. canola.

Se identificaron un total de 98 familias de bacterias ruminales, y la abundancia relativa superior al 0.1% del total se enumeran en el Cuadro 7. Las familias más abundantes en el tratamiento control fueron: *Prevotellaceae* (33.9 %), *Lachnospiraceae* (24.6 %), *Ruminococcaceae* (16.9 %), *Veillonellaceae* (11.5 %) *Paraprevotellaceae* (2.13 %) y *Succinivibrionaceae* (1.81 %). De estas familias, la abundancia relativa de *Ruminococcaceae* disminuyó (efecto cuadrático, $P < 0.05$) 46.2 y 31.3 % con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM respectivamente, y aumento un 6 % para el nivel niveles de 1.20 g AC/kg PVM. La abundancia relativa de *Veillonellaceae* aumentó (efecto lineal, $P < 0.05$) un 11 y 50 % con la adición de 0.80 y 1.20 g AC/kg PVM, respectivamente. Para la abundancia relativa de *Succinivibrionaceae*, se observó un aumento (efecto cuadrático, $P < 0.01$), en comparación con el control, del 350.8 y 146.4 % con la adición 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, respectivamente y una disminución del 58.6 con la adición de 1.2 g AC/kg PVM.

Para las familias con menos del 1% de abundancia, la abundancia relativa de *Pirullelaceae* disminuyó (efecto cuadrático, $P < 0.01$) en un 93 y 71.3 % con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, respectivamente y aumentó 12.5 % con la adición de 1.2 g AC/kg PVM. La abundancia relativa de *Mogibacteriaceae* disminuyó (efecto cuadrático, $P < 0.01$) en un 23.3 % con la adición de 0.4 g AC/kg PVM, y aumentó 30 y 110 % con la adición de 0.8 y 1.2 g AC/kg PVM, respectivamente.

Cuadro 7. Abundancia relativa (%) de las principales familias bacterianas en vacas suplementadas con aceite de canola (0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM).

Familia	Aceite de canola g/kg PVM ¹				EEM ²	Valor de P ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	C
<i>Methanobacteriaceae</i>	0.07	0.01	0.01	0.14	0.03	0.32	0.06
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.01	0.09	0.26	0.01	0.06	0.66	0.13
<i>Coriobacteriaceae</i>	0.13	0.14	0.21	0.17	0.02	0.62	0.72
BS11	0.13	0.01	0.21	0.07	0.04	0.97	0.84
<i>Bacteroidaceae</i>	0.18	0.12	0.08	0.29	0.05	0.36	0.06
<i>Prevotellaceae</i>	33.87	35.04	37.45	24.82	2.76	0.17	0.10
S24-7	1.48	2.66	2.85	2.49	0.31	0.45	0.42
<i>Paraprevotellaceae</i>	2.13	1.88	2.14	1.53	0.14	0.44	0.69
<i>Anaerolinaceae</i>	0.79	0.00	0.02	0.19	0.19	0.20	0.13
<i>Lactobacillaceae</i>	0.03	0.42	0.38	0.21	0.09	0.34	0.52
<i>Christensenellaceae</i>	0.19	0.08	0.19	0.29	0.04	0.31	0.27
<i>Clostridiaceae</i>	0.98	0.40	0.62	0.88	0.13	0.96	0.25
<i>Lachnospiraceae</i>	24.55	27.56	22.28	24.72	1.08	0.73	0.93
<i>Ruminococcaceae</i>	16.89	9.08	11.60	17.90	2.11	0.40	<0.01
<i>Veillonellaceae</i>	11.49	11.37	12.76	17.26	1.38	0.04	0.20
<i>Mogibacteriaceae</i>	0.30	0.23	0.39	0.63	0.09	0.04	0.17
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.68	0.49	0.74	0.93	0.09	0.32	0.29
<i>Pirellulaceae</i>	0.80	0.056	0.23	0.90	0.21	0.45	<0.01
<i>Methylobacteriaceae</i>	0.17	0.05	0.07	0.13	0.03	0.57	0.07
<i>Desulfohalobaceae</i>	0.07	0.16	0.14	0.24	0.04	0.08	0.95
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.88	1.37	1.37	2.53	0.35	0.03	0.44
<i>Succinivibrionaceae</i>	1.81	8.16	4.46	0.75	1.65	0.21	<0.01
<i>Spirochaetaceae</i>	0.42	0.18	0.33	0.19	0.06	0.20	0.61
<i>Dethiosulfovibrionaceae</i>	0.13	0.09	0.13	0.28	0.04	0.19	0.23
F16	1.06	0.20	0.25	0.67	0.20	0.41	0.06
RFP12	0.56	0.09	0.17	0.68	0.14	0.61	0.04
WCHB1-25	0.19	0.06	0.12	0.53	0.11	0.09	0.06

¹PVM, peso vivo mermado, $PV \times 0.96$ (NASEM, 2016); ²EEM, error estándar de la media; ³Valor de P lineal (L) y cuadrático (C).

La abundancia relativa de *Desulfovibrionaceae* aumentó (efecto lineal, $P < 0.05$) un 56, 55.9 y 188 % con la adición de 0.4, 0.80 y 1.20 g AC/kg PVM, respectivamente. La abundancia relativa de RFP12 disminuyó (efecto cuadrático, $P < 0.01$) en un 83.9 y 69.6 % con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, respectivamente y aumentó en un 21.4 % con la adición de 1.2 g AC/kg PVM.

El análisis ANOSIM ($r = 0.04861$, $P = 0.2282$) y ACP (Figura 8A) a nivel de género demuestran que no hay cambios significativos entre tratamientos.

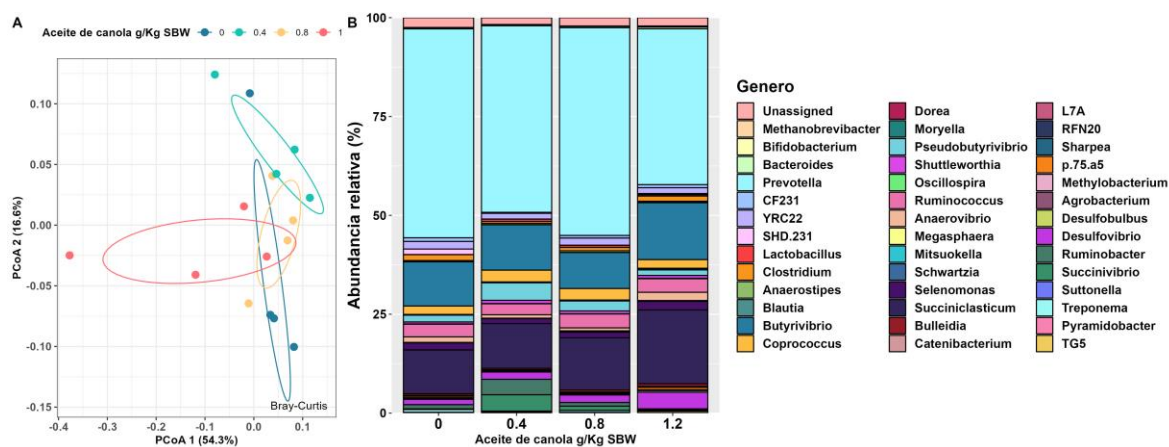


Figura 8. Diferencia en la composición de bacterias con la inclusión de aceite de canola a nivel de género. (A) Análisis de componentes principales (ACP); (B) Abundancia relativa (%) de bacterias.

Se identificaron un total de 316 géneros bacterianos y la abundancia relativa superior al 0.1% del total se enumera en Cuadro 8. Los géneros bacterianos predominantes en el tratamiento sin aceite son *Prevotella* (52.8 %), *Butyrivibrio* (11.2 %), *Succinilasticum* (11.1%) y *Ruminococcus* (3.2 %), cuyas abundancias relativas no se modificaron estadísticamente ($P > 0.05$) con la adición de AC. Para la abundancia relativa de *Pseudobutyrvibrio* se observó un aumento (efecto cuadrático, $P < 0.05$) de 158.1 y 45 % cuando se adiciona 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, respectivamente y una disminución del 19.2 % con la adición de 1.2 g AC/kg PVM. La abundancia relativa de *Anaerovibrio* disminuye (efecto cuadrático, $P < 0.01$) 38.1 y 46 % cuando se adiciona 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, respectivamente y aumenta 50.4 % cuando la adición es 1.2 g AC/kg PVM.

Para los géneros bacterianos con menos de 1% de abundancia, la abundancia relativa de *Succinivibrio* aumentó (efecto cuadrático, $P < 0.01$) 23.2 y 5.3 veces con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, respectivamente y disminuyó solo un 11.76 % con la adición de 1.2 g AC/kg PVM. En el caso de la abundancia relativa del género *Sharpea* solo se observa en los tratamientos con la adición de AC, esta abundancia es constante con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM y disminuye g/kg PVM considerablemente (72.7 %) con la adición de 1.2 g AC/kg PVM. Con la adición de 0.4, 0.8 y 1.20 g AC/kg PVM se disminuyó (efecto lineal, $P < 0.05$) la abundancia relativa de RFN20 (100, 81.8 y 72.7 %) y *Treponema* (62.7, 32.8 y 56.7 %).

Cuadro 8. Abundancia relativa (%) de los principales géneros bacterianos en vacas suplementadas con aceite de canola (0, 0.40, 0.80 y 1.20 g/kg PVM).

Género	Aceite de canola g/kg PVM ¹				EEM ²	Valor de P ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	C
No asignado	2.48	1.74	2.10	2.10	0.15	0.42	0.11
<i>Methanobrevibacter</i>	0.11	0.01	0.02	0.25	0.06	0.26	0.07
<i>Bifidobacterium</i>	0.01	0.12	0.33	0.02	0.07	0.71	0.18
<i>Bacteroides</i>	0.23	0.16	0.10	0.45	0.08	0.27	0.10
<i>Prevotella</i>	52.84	47.19	52.54	39.41	3.14	0.16	0.47
CF231	0.92	0.25	0.65	0.77	0.14	0.96	0.15
YRC22	1.92	1.47	1.81	1.47	0.12	0.41	0.80
SHD-231	1.38	0.00	0.03	0.29	0.33	0.82	0.05
<i>Lactobacillus</i>	0.05	0.58	0.53	0.33	0.12	0.50	0.20
<i>Clostridium</i>	1.50	0.50	0.84	1.33	0.23	0.92	0.13
<i>Anaerostipes</i>	0.24	0.33	0.42	0.25	0.04	0.84	0.25
<i>Blautia</i>	0.08	0.01	0.03	0.12	0.03	0.28	0.03
<i>Butyrivibrio</i>	11.17	11.47	9.10	14.39	1.09	0.47	0.29
<i>Coprococcus</i>	2.13	2.98	2.90	2.18	0.23	0.98	0.28
<i>Dorea</i>	0.09	0.10	0.06	0.11	0.01	0.82	0.57
<i>Moryella</i>	0.09	0.11	0.18	0.30	0.05	0.12	0.57
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	1.72	4.44	2.51	1.39	0.68	0.25	0.01
<i>Shuttleworthia</i>	0.51	0.82	0.72	0.73	0.07	0.34	0.26
<i>Oscillospira</i>	0.07	0.05	0.06	0.11	0.01	0.08	0.08
<i>Ruminococcus</i>	3.20	2.79	3.51	3.43	0.16	0.72	0.85
<i>Anaerovibrio</i>	1.39	0.86	0.75	2.09	0.31	0.08	<0.01
<i>Megasphaera</i>	0.04	0.03	0.23	0.05	0.05	0.38	0.74
<i>Mitsuokella</i>	0.04	0.03	0.08	0.06	0.01	0.28	0.72
<i>Schwartzia</i>	0.04	0.05	0.05	0.11	0.02	0.06	0.23
<i>Selenomonas</i>	1.78	1.25	1.41	2.16	0.20	0.36	0.08
<i>Succinoclasticum</i>	11.09	11.32	13.18	18.66	1.76	0.08	0.35
<i>Bulleidia</i>	0.42	0.40	0.56	0.69	0.07	0.45	0.78
<i>Catenibacterium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.54
L7A	0.10	0.03	0.08	0.17	0.03	0.14	0.06
RFN20	0.11	0.00	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01
<i>Sharpea</i>	0.00	0.11	0.11	0.03	0.03	0.43	0.01
p-75-a5	0.38	0.10	0.22	0.60	0.11	0.07	0.01
<i>Methylobacterium</i>	0.21	0.06	0.07	0.16	0.04	0.51	0.04
<i>Agrobacterium</i>	0.09	0.03	0.03	0.06	0.01	0.73	0.01
<i>Desulfobulbus</i>	0.10	0.21	0.18	0.39	0.06	0.06	0.55
<i>Desulfovibrio</i>	1.34	1.83	1.91	4.21	0.64	0.02	0.18
<i>Ruminobacter</i>	1.06	3.91	0.92	0.09	0.83	0.36	0.21
<i>Succinivibrio</i>	0.17	4.12	1.07	0.15	0.94	0.62	<0.01
<i>Suttonella</i>	0.02	0.14	0.05	0.09	0.03	0.45	0.34
<i>Treponema</i>	0.67	0.25	0.45	0.29	0.10	0.03	0.11
<i>Pyramidobacter</i>	0.05	0.04	0.08	0.08	0.01	0.23	0.91
TG5	0.17	0.08	0.11	0.36	0.06	0.15	0.08

¹PVM, peso vivo mermado, PV × 0.96 (NASEM, 2016); ²EEM, error estándar de la media; ³Valor de P linear (L) y cuadrático (C).

La adición del AC en 0.4 y 0.8 g/kg PVM disminuyeron (efecto cuadrático, $P < 0.05$) la abundancia relativa de *Agrobacterium* (66.7 % en ambos tratamientos) y *Methylobacterium* (71.4 y 66.7 %), respectivamente, con la adición de 1.2 g AC/kg PVM la disminución fue menos marcada, con un 33.3 y 23.81 % para *Agrobacterium* y *Methylobacterium*, respectivamente. Las abundancias relativas disminuyen (efecto cuadrático, $P < 0.05$) con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM en un 73.7 y 42.1 % para p-75-a5 y 87.5 y 62.5 % para *Blautia*, respectivamente y aumentaron en un 57% para p-75-a5 y 50 % para *Blautia* con la adición de 1.2 g AC/kg PVM.

8 DISCUSIÓN

8.1 Consumo y digestibilidad

La composición química de *Urochloa sp.* No es diferente a la reportada en estudios previos considerando un estado de madurez similar (Avellaneda *et al.*, 2008) y pese a la adición de AC y complementación del concentrado, no se observó ninguna diferencia en el consumo del pasto. Vázquez y Smith (2000) mencionan que, de forma general, la oferta de concentrado a los animales en pastoreo reduce el consumo de pasto debido a un efecto sustitutivo, aumentando el CMS total.

Con la adición de 0.4, 0.8 y 1.2 g AC/kg PVM no se encontraron diferencias significativas sobre la digestibilidad de la MS en vacas en pastoreo y suplementadas con concentrado, la fermentación ruminal no se vio afectada negativamente, pero si se observó una disminución en las emisiones de CH₄, de hasta en un 17.5 % en los animales que recibieron 1.2 g AC/kg PVM. Además, hubo un efecto lineal, sin impacto en el CMS en animales que recibieron o no AC.

Los animales en este estudio tuvieron un consumo de grasa total de 2.66, 4.53, 6.67 y 8.30 % correspondiente a la adición con AC de 0.0, 0.40, 0.80 y 1.20 g AC/kg PVM respectivamente. Aunque los animales con el nivel de AC más alto tenían una ingesta de grasas del 8.3 %, no se observó ningún efecto sobre el consumo. Se ha indicado que la adición de lípidos por encima del 7 % del CMS, generalmente disminuyen el consumo debido a un aumento de los ácidos grasos insaturados (AGI) circulantes que provocan la activación del receptor en el centro de saciedad del hipotálamo y una reducción potencial de la digestibilidad de la fibra que retrasa la tasa de pasaje (Allen, 2000; Kumar, 2014).

Varios mecanismos pueden explicar cómo los lípidos de la dieta interfieren con la fermentación ruminal, como cuando los AG de cadena larga (presentes en el AC) escapan a la biohidrogenación y son potencialmente tóxicos para las bacterias responsables de la degradación de la fibra (celulolítica, gram+) y para los metanógenos y protozoos (Desbois y Smith, 2010; Zeitz *et al.*, 2013). Además, las grasas forman una capa física sobre la fibra, evitando la degradación microbiana, que tiene un efecto perjudicial sobre el consumo voluntario (Jenkins, 1993). Sin embargo, la restricción de los niveles de grasas suplementarias en función del porcentaje de inclusión en la dieta de los rumiantes es un concepto limitado. Actualmente, un mejor indicador utilizado, es el consumo total de lípidos/kg de peso vivo con la cantidad recomendada de un g de consumo de lípidos/kg de peso (Zinn y Jorquera, 2007). En el presente experimento, la proporción

de ingesta de lípidos fue de 0.49, 0.91, 1.27 y 1.68 g/kg de PVM para niveles de adición de 0.0, 0.40, 0.80 y 1.20 g de AC/kg de PVM, respectivamente. Por lo tanto, se esperaba una posible reducción potencial en el CMS con tratamientos de 0.80 y 1.20 AC/kg PVM según lo reportado en la literatura.

No obstante, los efectos de agregar aceites en la dieta, sobre el consumo y la digestibilidad de las dietas basadas en forraje fresco han sido inconsistentes. Algunos estudios adicionando aceite en dietas basadas en forrajes, indican reducciones tanto en el consumo, como en la digestibilidad general de la dieta (Beauchemin y McGinn 2006; Pavan *et al.*, 2007; Cosgrove *et al.*, 2008), mientras que otros estudios no encontraron ningún efecto sobre el consumo (King *et al.*, 1990; Woodward *et al.*, 2006). En general, la oferta de concentrado a los animales en pastoreo reduce el consumo de pasto debido a un efecto sustitutivo, pero aumenta el CMS total (Vázquez y Smith, 2000). La adición de AC incrementó el CMS hasta en un 16 % en el nivel más alto de inclusión (Cuadro 3), aumentando el consumo de EB (Mcal/d) hasta en un 26 %. El efecto del aumento del CMS, observado en el presente estudio, concuerda con Piñares-Patiño (2016) donde novillos pastoreando pastos templados, reportaron un aumento de CMS de 9.4 %. En un informe anterior, Reid (1959) indica que la adición constante de aceite a la pradera puede no producir cambios abruptos en el ambiente y la función del rumen, por lo que el consumo de MS no debe verse afectado negativamente.

La digestibilidad de los nutrientes no se afectó por la adición de AC, excepto por un aumento en la digestibilidad de la energía (Mcal/kg; $P < 0.05$) a medida que aumentaba la adición de AC. Ueda *et al.* (2003) informaron que vacas que no recibieron suplementos, la digestibilidad de la MO ruminal y fibra aumentaron notablemente con la adición de 3 % de aceite de linaza (equivalente a 1.55 g aceite/kg de PV) en vacas con una dieta rica en forraje, sin efecto en la digestibilidad total del tracto de MO y FDN. Por lo tanto, con consumos similares, el ganado que recibe aceites suplementarios tiene una mayor disponibilidad de energía incluso cuando la digestibilidad de algunas fracciones (es decir, FDN) puede verse afectada.

8.2 Fermentación ruminal

En el presente estudio, la proporción de acetato:propionato disminuyó significativamente con la adición de AC, lo cual es consistente con los hallazgos de Beauchemin y McGinn (2006) donde a pesar de esta disminución en la proporción de acetato y el aumento de propionato, no se

registró efecto en la disminución en las emisiones de CH₄. Los valores de los parámetros ruminales concuerdan con lo informado por Ribiero *et al.*, (2016), en bovinos Nellore con una dieta basada en caña de azúcar con diferentes porciones de concentrado (30 a 80 %) para N-NH₃ (18.7 a 30 mg/dL), pH (6.49 a 6.01) y protozoos totales (2 127 a 1 748 ×10⁴/ml).

8.3 Emisiones de metano

La emisión de CH₄ entérico (g CH₄/kg CMS) en las vacas de control sin AC en este estudio fue de 26.3 g CH₄/kg CMS (rango 21.7–26.3 g CH₄/kg CMS), es mayor a los valores determinados por Kennedy y Charmley (2012) para ganado que consume pastos y leguminosas tropicales (19.6 g/kg CMS) y por Beauchemin y McGinn (2006; 20 g CH₄/kg CMS) para ganado con ensilaje de cebada (75 %) y dieta de granos de cebada, laminados al vapor (19 %). Sin embargo, ligeramente inferior a los 28 g de CH₄/kg de CMS informados para el pastoreo de ganado en potreros con *Leucaena* (McGinn *et al.*, 2011). Aunque la técnica de medición de las emisiones de CH₄ podría ser una variación entre diferentes trabajos, la metodología “*sniffer*” modificada empleada en este estudio produciría resultados similares a los reportados previamente para bovinos en condiciones comparables.

Las emisiones de CH₄ estimadas en vacas en pastoreo en este estudio se redujeron linealmente según el nivel de inclusión de AC en la dieta, y la mayor inclusión redujo casi un 17 % la producción diaria de metano. Varios estudios han reportado que los lípidos reducen la producción de CH₄ en el rumen por diferentes mecanismos (Dohme *et al.*, 2001; Machmüller *et al.*, 2001; Bayat *et al.*, 2018; Muñoz *et al.*, 2019; Nogueira *et al.*, 2020). Similar a nuestros hallazgos, Moate *et al.* (2011) demostraron que las dietas de vacas lactantes (proporción 60:40 de forraje: concentrado) que contenían 51, 52 y 65 g de grasa/kg de MS, redujeron las emisiones de CH₄ (g/d) de forma lineal (7.6, 4.5 y 10.2 %, respectivamente), en comparación con una dieta de control. Beauchemin *et al.* (2007), reportaron que la adición de aceite de girasol, rico en ácido linoleico (C18:2), fue efectivo en la reducción de las emisiones de CH₄ en 14 % (1 77.4 vs 152.7 g/d) y 11.5 % (20 vs 17.7 g/kg de CMS) cuando se incluye al 3.4 %. Un estudio de Woodward *et al.* (2006), llevado a cabo con vacas lecheras lactantes alimentadas con forraje *Lolium perenne* (13.5–15.0 kg CMS/d) suplementado con 500 g de aceite de pescado, reportan una reducción (en comparación con el control) en la producción de CH₄ del 27 %. En general, estos estudios muestran que la adición de ácidos grasos (grasas o aceites) a las dietas del ganado parece tener un efecto

decreciente en las emisiones de CH₄, independientemente de la fuente y el alimento que se ofrezca a los animales.

En el presente estudio, la tasa a la que se disminuyó el CH₄ fue de 3.6 % por cada 1.0 % de aceite agregado a la dieta. En consonancia con esto, Martin *et al.* (2010) en un metaanálisis con 67 dietas *in vivo* para ovejas, carne y ganado lechero, estimaron una disminución promedio del 3.8 % en el CH₄ entérico (g/kg CMS) con cada uno % de grasa añadida. A partir de un estudio de metaanálisis similar en ganado, por cada aumento porcentual de grasas, las emisiones de CH₄ disminuyen en 13.4 g/día (es decir, 3.77 % en comparación con dietas sin grasa) o 0.66 g/kg CMS (n=105) dentro de las concentraciones de grasa en la dieta de 1.24–11.4 % (Patra, 2013). En un reciente estudio de metaanálisis en ganado lechero (12 estudios que incluyeron 362 mediciones individuales) bajo una dieta integral estándar que contenía 30 g de lípidos/kg CMS, los investigadores estimaron que por cada uno % de grasa adicional en la dieta, las emisiones de CH₄ se redujeron en aproximadamente 3.5 % (Moate *et al.*, 2016), Con esto podemos concluir que los resultados encontrados son similares a los reportados en la literatura.

En el presente trabajo, la disminución de CH₄ podría explicarse por un efecto directo del AC en la metanogénesis ruminal, aunque parte también podría ser por la complementación del concentrado. A pesar de que no se encontró una diferencia estadística significativa (P = 0.06) para la digestibilidad de la FDN, podríamos considerar que la adición de AC tendió a reducir la FDN total del tracto, más del 90% de la digestión total de FDN ocurre en el rumen (Huhtanen *et al.*, 2010). Hristov *et al.* (2013a) consideran que los concentrados pueden influir en la reducción del CH₄ entérico del 35 al 40 % de inclusión, pero a niveles de inclusión más altos (> 40 %), se puede observar una disminución en la digestibilidad de la fibra. Con lo anterior, podemos concluir que la disminución de las emisiones de CH₄ en este estudio no se debió mayormente a la cantidad de FDN digerida (Cuadro 3).

En este estudio observamos un rango de Y_m entre 6.7 a 9.03 % (promedio 7.9 %), el cual, disminuyó a 6.7 % con la mayor adición de AC. La disminución de las emisiones de CH₄ también se pueden evaluar como pérdida de energía, en proporción al % CEB, variable conocida como Y_m, el cual es importante para determinar el efecto sobre la eficiencia de utilización de energía del animal (Beauchemin *et al.* 2022). La emisión de CH₄ entérico representa una pérdida de 2 a 12 % del CEB (Johnson y Johnson, 1995). El IPCC (2006, nivel 2) utiliza la conversión del factor Y_m =

6,5 % + 1 % de GEI para ganado no engordado en corral (alimentado con dieta con < 90 % de concentrado del consumo total). Sin embargo, se desarrolló a partir de un conjunto de datos sobre *B. taurus* alimentados en climas templados. Usando varios estudios para estimar modelos en condiciones tropicales, el valor promedio de Ym fue de 5.84 % con un rango de 1.96 a 10.6 (Patra, 2017). Kaewpila y Sommart (2016) indican que el valor en condiciones tropicales es de 8.4 % ± 0.4 %. Tee *et al.* (2022) estimaron el valor de Ym en 8.3 %, en sistemas bovinos de carne tropicales y cuando se alimentan con dietas con mayor contenido de forraje. Será importante desarrollar modelos que estimen el factor de conversión de metano, considerando diferentes situaciones dietéticas como como la concentración de lípidos en la dieta.

8.4 Caracterización de la población ruminal microbiana

El conteo de protozoos en el rumen disminuyó tanto en protozoarios totales como para *Entodiniidae* y *Holotrichidae* con la adición de AC. Este efecto está reportado en la literatura donde la adición de ácidos grasos puede tener un efecto tóxico sobre los protozoos del rumen (Machmüller y Kreuzer, 1999; Onetti *et al.* 2001) disminuyendo también la población de metanógenos (Desbois y Smith, 2010; Zeitz *et al.*, 2013).

En el análisis de diversidad alfa, los índices Shannon y Chao1 (diversidad y riqueza) no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Para el análisis de diversidad beta, el análisis UniFrac ACP ponderado y no ponderado, no se muestran agrupamientos lo que demuestra que no hay diferencia en la abundancia de OTUs. La diversidad alfa hace referencia a la diversidad que se encuentra en una sola población (diversidad dentro de la muestra), mientras que la diversidad beta expresa la similitud o diferencia entre poblaciones (entre muestras).

En cuanto las asignaciones taxonómicas, en promedio, los grupos taxonómicos más abundantes a nivel de filo fueron *Firmicutes* (54.6 %), *Bacteroidetes* (34.8) y *Protobacterias* (5.4 %), Lo cual concuerda con Omontese *et al.* (2022) quienes reportan, para *Bacteroidetes* (37%), *Firmicutes* (35%) y *Proteobacteria* (12%) con animales en el periodo del destete a la engorda. Vasta *et al.* (2019) mencionan que la dieta es un factor clave que modula la comunidad microbiana y, en consecuencia, la biohidrogenación de los AG en el rumen. Sin embargo, la raza también puede influir en la microbiota ruminal, las emisiones de CH₄ y la eficiencia alimenticia (Paz *et al.*, 2016; Roehe *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019a,b) además de la edad y la etapa de crecimiento (Jami *et al.*,

2015). Por lo tanto, la presencia de AG funcionales en productos animales puede verse influenciada tanto por la genética del huésped como por la estrategia de alimentación (Vasta *et al.*, 2019).

También a nivel de filo, *Euryarchaeota*, donde pertenecen la familia *Methanobacteriaceae* y el género *Methanobrevibacter*, disminuyó con la adición de hasta 0.8 g/kg PVM de AC, las Estas arqueas metanogénicas están íntimamente relacionadas con la producción de CH₄ entérico en rumiantes. Las arqueas de géneros no clasificados pertenecientes al filo *Euryarchaeota* mostraron la mayor actividad en el epitelio del rumen de novillos con RFI bajo ($81.3 \pm 1.9\%$) y RFI alto ($76.4 \pm 3.0\%$). Las bacterias de la familia *Succinivibrionaceae* mostraron la mayor actividad de bacterias en el epitelio RFI bajo ($28.7 \pm 9.0\%$) y RFI alto ($33.9 \pm 8.8\%$; Tan *et al.*, 2021). Tan *et al.* (2021) mencionan que la *Archaea* perteneciente a *Methanobrevibacter* fue la más predominante en la fase líquida y sólida de la microbiota del rumen, y suponen que este género de arqueas también es el más activo en la comunidad de arqueas epimurales del rumen. Estudios previos han mostrado marcados efectos de la dieta en las comunidades microbianas del rumen (Singh *et al.*, 2014; Veneman *et al.*, 2015; Henderson *et al.*, 2015), en las condiciones del presente estudio, las diferencias fueron cuadráticas, el único con diferencia lineal (negativa) fue *Tenericutes*; Niu *et al.* (2015) mencionan que los *Tenericutes* están asociados con la digestibilidad de la fibra en monogástricos, aunque aún no está claro su rol en el rumen (Deusch *et al.*, 2017).

Smith *et al.* (2020) encontraron que las proteobacterias (filo) estaban negativamente asociadas con la producción de CH₄ cuando se expresaban diariamente o por unidad de MO degradada. Por otro lado, se ha demostrado que un aumento en la proporción de grasas insaturadas en la dieta aumenta la abundancia de *Succinivibrionaceae* y *Succinivibrio* (pertenecientes al filo proteobacteria) en bovinos y ovinos (Huws *et al.*, 2016; Lyons *et al.*, 2017). Los resultados de la presente investigación coinciden con lo encontrado en literatura, sin embargo, en el tratamiento de mayor inclusión de AC (1.2 g/kg PVM) dicho efecto pierde efectividad, para lo cual, no encontramos alguna explicación.

Pese a que la abundancia relativa de *Firmicutes* solo representó una tendencia ($P = 0.05$) de disminución con la adición de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM, es importante comprender los posibles efectos en la microbiota ruminal. Las bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes*, son degradadores conocidos de celulosa y hemicelulosa (Krause *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2015; Huws *et al.*, 2016; Mayorga *et al.*, 2016) mientras que otros miembros de la familia son productores de CO₂ y H₂

(Marounek y Dušková, 1999; Rooke *et al.*, 2014). De acuerdo con la literatura (Bryant y Small, 1956; Evans *et al.* 2011), la abundancia de *Firmicutes* estuvo fuertemente correlacionada con la digestibilidad de FND y la producción diaria de gas. Además, es probable que la fuerte relación entre la abundancia de *Firmicutes* y la producción de CH₄ (diaria y por unidad de MO degradada) se deba a las capacidades fibrolíticas de los miembros de este filo, efecto encontrado en este trabajo.

9 CONCLUSIONES

1. El aceite de canola suplementado a 1.2 g AC/kg PVM (5.8% de la dieta total en MS) en vacas en pastoreo de forrajes tropicales y complementadas con una cantidad fija de concentrado comercial, aumentan el consumo total de energía, el valor de ED (Mcal /kg) de la dieta hasta en un 12.4%.
2. Las emisiones de CH₄ entérico (MER, mg/min; CH₄, g/d; CH₄, g/kg CMS; CH₄, % CEB (o Ym) disminuyeron con la adición de aceite de canola.
3. Al incrementar la adición de aceite de canola, el CH₄ (g/kg CMS), disminuye hasta 17.5%.
4. La pérdida de energía por metano, Ym (CH₄, % CEB), disminuyó de 12 a 25.8 % a medida que aumentaba el nivel de aceite de canola.
5. La tasa a la que disminuyó el CH₄ g/d fue de 3.6% por cada 1% de aceite agregado a la dieta.
6. Las abundancias relativas bacterianas se encontraron en una proporción óptima a niveles de 0.4 y 0.8 g AC/kg PVM.

Perspectivas a futuro: Se deben evaluar otras fuentes alternativas de aceite, como las semillas de árboles, en sistemas de producción sostenibles para condiciones tropicales. Aunque el objetivo principal de este experimento fue determinar el nivel de adición de aceite en el consumo de energía y la disminución de la producción de CH₄ en el ganado en condiciones tropicales, su inclusión en la dieta de ganado en pastoreo bajo condiciones tropicales puede tener un costo prohibitivo. Sin embargo, plantas tropicales como la semilla de *Moringa oleifera*, que tiene hasta un 40 % de aceite (Leone *et al.*, 2016), pueden ser una alternativa para sistemas de producción ganadera sostenible que permitan aumentar el aporte energético de la dieta y reducir las emisiones de metano.

10 REFERENCIAS

- Adeyemi, K.D., Sazili, A.Q., Ebrahimi, M., Samsudin, A.A., Alimon, A.R., Karim, R., ... & Sabow, A. B. 2016. Effects of blend of canola oil and palm oil on nutrient intake and digestibility, growth performance, rumen fermentation and fatty acids in goats. *Animal Science Journal*, 87(9), 1137-1147.
- Agueda, M., Zulet, M.Á., & Martínez, J.A. 2009. Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(3), 245.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. 2012. World Agriculture towards 2030/2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Alford, A.R., Hegarty, R.S., Parnell, P.F., Cacho, O.J., Herd, R.M., & Griffith, G.R. 2006. The impact of breeding to reduce residual feed intake on enteric methane emissions from the Australian beef industry. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(7), 813-820.
- Allen, M.S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 83 (7), 1598-1624.
- Appuhamy, J.R.N., Strathe, A.B., Jayasundara, S., Wagner-Riddle, C., Dijkstra, J., France, J., & Kebreab, E. 2013. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5161-5173.
- Archer, J.A., Richardson, E.C., Herd, R.M., & Arthur, P.F. 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(2), 147-162.
- Arthur, P.F., Barchia, I.M., Weber, C., Bird-Gardiner, T., Donoghue, K.A., Herd, R.M., & Hegarty, R.S. 2017. Optimizing test procedures for estimating daily methane and carbon dioxide emissions in cattle using short-term breath measures. *Journal of Animal Science*, 95(2), 645-656.
- Association of Official Analytical chemists – AOAC. 2015. Official methods of analysis. 19th ed. Association of Official Analytical Chemists, Urbana. USA.
- Association of Official Analytical chemists – AOAC. 2019. Official methods of analysis. 21st ed. Association of Official Analytical Chemists, Urbana. USA.
- Audsley, E., and Wilkinson, M. 2014. What is the potential for reducing national greenhouse gas emissions from crop and livestock production systems? *Journal of Cleaner production*, 73, 263-268.
- Avellaneda Cevallos, J., Cabezas Guerrero, F., Quintana Zamora, G., Luna Murillo, R., Montañez Valdez, O.D., Espinoza Guerra, I. and Pinargote Mendoza, E. 2008. Agronomic behavior and chemical composition of three varieties of "Brachiaria" at different harvest ages. *Science and technology (Quevedo)*, 1 (2), 87-94.
- Baca-González, V., Asensio-Calavia, P., González-Acosta, S., Pérez de la Lastra, J.M., & Morales de la Nuez, A. 2020. Are vaccines the solution for methane emissions from ruminants? A systematic review. *Vaccines*, 8(3), 460.
- Barthram, G. T. 1984. Experimental techniques: the HFRO sward stick. *Biennial report, 1985*, 29-30.
- Basarab, J.A., Beauchemin, K.A., Baron, V.S., Ominski, K.H., Guan, L.L., Miller, S.P., & Crowley, J.J. 2013. Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: effects on economically important traits and enteric methane production. *Animal*, 7(s2), 303-315.
- Bayat, A.R., Tapio, I., Vilkki, J., Shingfield, K.J. and Leskinen, H. 2018. Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass

- silage-based diets without affecting milk yield. *Journal of dairy science*, 101 (2), 1136-1151.
- Beauchemin, K.A. 2015. Mitigation of enteric methane production through efficient feeding of dairy cows. Memories of the XVII Biennial Congress, Mexican Association of Specialists in Animal Nutrition. Puerto Vallarta, Jal. México.
- Beauchemin, K.A., & McGinn, S.M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of animal science*, 83(3), 653-661.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'mara, F., & McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 21-27.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84 (6), 1489-1496.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Petit, H.V. 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87 (3), 431-440.
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Abdalla, A.L., Alvarez, C., Arndt, C., Becquet, P., ... and Kebreab, E. 2022. Invited review: Current enteric methane mitigation options. *Journal of Dairy Science*.105(12), 9297-9326.
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J., & Wang, M. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*,14(S1), s2-s16.
- Benchaar, C., & Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 338-355.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 209-228.
- Benchaar, C., Pomar, C., & Chiquette, J. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science*, 81(4), 563-574.
- Black, J.L., Davison, T.M., & Box, I. 2021. Methane emissions from ruminants in Australia: mitigation potential and applicability of mitigation strategies. *Animals*, 11(4), 951.
- Blaxter, K.L., & Clapperton, J.L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of nutrition*, 19(1), 511-522.
- Bonilla Cárdenas, J.A.; Lemus Flores, C. 2012. Emission of enteric methane by ruminants and its contribution to global warming and climate change: Review. *Mexican Journal of Livestock Sciences*, 3 (2), 215-246.
- Breidenich, C., Magraw, D., Rowley, A., & Rubin, J.W. 1998. The Kyoto protocol to the United Nations framework convention on climate change. *American Journal of International Law*, 92(2), 315-331.
- Breider, I.S., Wall, E., & Garnsworthy, P.C. 2019. Heritability of methane production and genetic correlations with milk yield and body weight in Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7277-7281.
- Brouček, J. 2014. Methods of methane measurement in ruminants. *Slovak Journal of Animal Science*, 47(1), 51-60.
- Bryant, M. P., & Small, N. 1956. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. *Journal of bacteriology*, 72(1), 22-26.

- Buttigieg, P.L., Ramette, A., 2014. A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS Microbiology Ecology* 90, 543–550.
- Cambra-López, M., García Rebollar, P., Estellés, F., & Torres, A. 2008. Estimation of emissions from ruminants in Spain: the methane conversion factor. *Archivos de Zootecnia*, 57(R), 89-101.
- Cannas, A., Tedeschi, L.O., Fox, D.G., Pell, A.N., Van Soest, P.J. 2004. A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. *Journal of Animal Science*, 82(1), 149-169.
- Canul-Solis, J., Campos-Navarrete, M., Piñero-Vázquez, A., Casanova-Lugo, F., Barros-Rodríguez, M., Chay-Canul, A., ... & Castillo-Sánchez, L. 2020. Mitigation of rumen methane emissions with foliage and pods of tropical trees. *Animals*, 10(5), 843.
- Capper, J. L., & Bauman, D. E. 2013. The role of productivity in improving the environmental sustainability of ruminant production systems. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 1(1), 469-489.
- Carpenter, L. J., Reimann, S., Burkholder, J. B., Clerbaux, C., Hall, B. D., Hossaini, R., ... & Blake, D. R. 2014. Update on ozone-depleting substances (ODSs) and other gases of interest to the Montreal protocol. *Scientific assessment of ozone depletion: 2014*, 1-1.
- Carro, M.D., & Ungerfeld, E.M. 2015. Utilization of organic acids to manipulate ruminal fermentation and improve ruminant productivity. *Rumen microbiology: From evolution to revolution*, 177-197.
- Chaves, A.V., Thompson, L.C., Iwaasa, A.D., Scott, S.L., Olson, M.E., Benchaar, C., ... & McAllister, T.A. 2006. Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Canadian Journal of Animal Science*, 86(3), 409-418.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., & Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545, 556-568.
- Cochran, W.G., Cox, G.M. 1992. Experimental designs. 2nd ed. Wiley Classics Library. (John Wiley & Sons). New York, USA.
- Collins, W.J., Fry, M.M., Yu, H., Fuglestedt, J. S., Shindell, D. T., & West, J. J. 2013. Global and regional temperature-change potentials for near-term climate forcers. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(5), 2471-2485.
- Conway, E.J., O'malley, E. 1942. Microdiffusion methods. Ammonia and urea using buffered absorbents (revised methods for ranges greater than 10 μ g. N). *Biochemical Journal*, 36 (7-9), 655.
- Cook, C. W. 1964. Symposium on nutrition of forages and pastures: collecting forage samples representative of ingested material of grazing animals for nutritional studies. *Journal of Animal Science*, 23(1), 265-270.
- Cosgrove, G.P., Waghorn, G.C., Anderson, C.B., Peters, J.S., Smith, A., Molano, G., Deighton, M. 2008. The effect of oils fed to sheep on methane production and digestion of ryegrass pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48 (2), 189-192.
- Costa, D.F.A., Correia, P.S., Dorea, J.R.R., de Souza, J., de Souza Congio, G.F., Pires, A.V., ... & Santos, F.A.P. 2020. Strategic supplementation of growing cattle on tropical pastures improves nutrient use and animal performance, with fewer days required on the finishing phase. *Animal Production Science*, 61(5), 480-493.
- Cottle, D.J., Nolan, J.V., & Wiedemann, S.G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science*, 51(6), 491-514.

- Cristofanelli, P., Brattich, E., Decesari, S., Landi, T. C., Maione, M., Putero, D., ... & Bonasoni, P. 2018. Non-CO₂ Greenhouse Gases. In *High-Mountain Atmospheric Research* (pp. 15-43). Springer, Cham.
- Dai, X., Tian, Y., Li, J., Su, X., Wang, X., Zhao, S., ... & Huang, L. 2015. Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in the cow rumen. *Applied and environmental microbiology*, 81(4), 1375-1386.
- DasSarma, S., Coker, J.A., DasSarma, P. 2009. Archaea (Overview). M. Schaechter (Ed.), Desk Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, Incorporated, San Diego, pp. 118-139.
- de Souza, C.G.F., Bannink, A., Mogollón, O.L.M., Jaurena, G., Gonda, H., Gere, J.I., ... & Hristov, A.N. 2021. Enteric methane mitigation strategies for ruminant livestock systems in the Latin America and Caribbean region: A meta-analysis. *Journal of Cleaner Production*, 312, 127693.
- Desbois, A.P., Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 85 (6), 1629-1642.
- Deusch, S., Camarinha-Silva, A., Conrad, J., Beifuss, U., Rodehutsord, M., & Seifert, J. 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Frontiers in microbiology*, 8, 1605.
- Dijkstra, J., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., & Van Gastelen, S. 2018. Antimethanogenic effects of 3-nitrooxypropanol depend on supplementation dose, dietary fiber content, and cattle type. *Journal of dairy science*, 101(10), 9041-9047.
- Diniz, E.M. 2007. Lessons from the Kyoto protocol. *Ambiente & sociedade*, 10, 27-38.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M. 2001. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology*, 32 (1), 47-51.
- Duin, E.C., Wagner, T., Shima, S., Prakash, D., Cronin, B., Yáñez-Ruiz, D.R., ... & Kindermann, M. 2016. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), 6172-6177.
- Duval S., Kindermann M. 2012. Use of Nitrooxy Organic Molecules in Feed for Reducing Enteric Methane Emissions in Ruminants, and/or to Improve Ruminant Performance. WO2012084629A1. *International Patent*. April 28.
- e Silva, B.M., Lopes, F.C.F., Pereira, L.G.R., Tomich, T.R., Morenz, M.J.F., Martins, C.E., ... & Chaves, A.V. 2017. Effect of sunflower oil supplementation on methane emissions of dairy cows grazing *Urochloa brizantha* cv. marandu1. *Animal Production Science*, 57(7), 1431-1436.
- Eckard, R.J., Grainger, C., & De Klein, C.A.M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock science*, 130(1), 47-56.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., & Emery, E.M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of dairy science*, 44, 1768-1771.
- Estrada-Angulo, A., Castro-Pérez, B.I., Urías-Estrada, J.D., Ríos-Rincón, F.G., Arteaga-Wences, Y.J., Barreras, A., López-Soto, M.A., Plasencia, A., Zinn, R.A. 2018. Influence of protein level on growth performance, dietary energetics and carcass characteristics of Pelibuey × Katahdin lambs finished with isocaloric diets. *Small Ruminant Research*, 160, 59-64.
- Eugène, M., Massé, D., Chiquette, J., & Benchaar, C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 88(2), 331-337.

- Evans, N. J., Brown, J. M., Murray, R. D., Getty, B., Birtles, R. J., Hart, C. A., & Carter, S. D. 2011. Characterization of novel bovine gastrointestinal tract *Treponema* isolates and comparison with bovine digital dermatitis treponemes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 138-147.
- Feng, X.Y., Dijkstra, J., Bannink, A., Van Gastelen, S., France, J., & Kebreab, E. 2020. Antimethanogenic effects of nitrate supplementation in cattle: A meta-analysis. *Journal of dairy science*, 103(12), 11375-11385.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5^{ta} ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de geografía. México. ISBN 970-32-1010-4.
- Garnsworthy, P.C., Craigon, J., Hernandez-Medrano, J.H., Saunders, N. 2012. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of dairy science*, 95 (6), 3166-3180.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Ghosh, A., Patra, P.K., Ishijima, K., Umezawa, T., Ito, A., Etheridge, D.M., ... & Krummel, P.B. 2015. Variations in global methane sources and sinks during 1910–2010. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(5), 2595-2612.
- Giger-Reverdin, S., Morand-Fehr, P., & Tran, G. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livestock production science*, 82(1), 73-79.
- Glasser, F., Ferlay, A., & Chilliard, Y. 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4687-4703.
- Glasson, C.R., Kinley, R.D., de Nys, R., King, N., Adams, S.L., Packer, M.A., ... & Magnusson, M. 2022. Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. *Algal Research*, 64, 102673.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications) (No. 379). US Agricultural Research Service.
- Goopy, J.P., Chang, C., & Tomkins, N. 2016. A comparison of methodologies for measuring methane emissions from ruminants. *Methods for measuring greenhouse gas balances and evaluating mitigation options in smallholder agriculture*, 97-117.
- Grainger, C., Auldist, M.J., Clarke, T., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Hannah, M.C., ... & Lowe, L.B. 2008. Use of monensin controlled-release capsules to reduce methane emissions and improve milk production of dairy cows offered pasture supplemented with grain. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 1159-1165.
- Grainger, C., Beauchemin, K.A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal feed science and technology*, 166, 308-320.
- Hammond, K.J., Waghorn, G.C., & Hegarty, R.S. 2016. The GreenFeed system for measurement of enteric methane emission from cattle. *Animal Production Science*, 56(3), 181-189.
- Hegarty, R.S. 2013. Applicability of short-term emission measurements for on-farm quantification of enteric methane. *Animal*, 7, 401-408.

- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., & Janssen, P. H. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*, 5(1), 14567.
- Herd, R.M., & Arthur, P.F. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of animal science*, 87(suppl_14), E64-E71.
- Herd, R.M., & Bishop, S.C. 2000. Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in British Hereford cattle. *Livestock Production Science*, 63(2), 111-119.
- Hernández M.J.H. 2017. Estimación de las emisiones de metano individual durante la ordeña mediante medición directa en granja en las memorias de “Avances en técnicas para mitigar la emisión de gases de efecto invernadero por rumiantes en México” 8 y 9 de junio de 2017. CEIEPAA-UNAM. 140-151.
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P., Thornton, P.K., Conant, R.T., Smith, P., ... & Stehfest, E. 2016. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, 6(5), 452-461.
- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A.D.G., Bishop-Hurley, G., & Kalantar-Zadeh, K. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 26-35.
- Hoover, W.H., & Miller, T.K. 1991. Rumen digestive physiology and microbial ecology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 7(2), 311-325.
- Hristov, A.N., Kebreab, E., Niu, M., Oh, J., Bannink, A., Bayat, A.R., ... & Yu, Z. 2018. Symposium review: Uncertainties in enteric methane inventories, measurement techniques, and prediction models. *Journal of dairy science*, 101(7), 6655-6674.
- Hristov, A.N., Melgar, A., Wasson, D., & Arndt, C. 2022. Symposium review: Effective nutritional strategies to mitigate enteric methane in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 105 (10) 8543-8557.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E.; Waghorn, G., Gerber, P.J. 2013a. Special topics, Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of animal science*, 91 (11), 5045-5069.
- Hristov, A.N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T.W., Harper, M.T., Weeks, H.L., ... & Duval, S. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the national academy of sciences*, 112(34), 10663-10668.
- Hristov, A.N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J., Oosting, S., 2013b. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production – a review of technical options for non-CO2 emissions. In: Gerber, Pierre J., Henderson, Benjamin, Harinder, P.S., Makkar (Eds.), FAO Animal Production and Health Paper No. 177. FAO, Rome, Italy.
- Huhtanen, P., Ahvenjärvi, S., Broderick, G.A., Reynal, S.M., Shingfield, K.J. 2010. Quantifying ruminal digestion of organic matter and neutral detergent fiber using the omasal sampling technique in cattle, A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93 (7), 3203–3215.
- Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E. H., Utsumi, S., & Zimmerman, S. 2015. Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. *Journal of dairy science*, 98(5), 3394-3409.

- Hurst, D.F., Oltmans, S.J., Vömel, H., Rosenlof, K.H., Davis, S.M., Ray, E.A., ... & Jordan, A. F. 2011. Stratospheric water vapor trends over Boulder, Colorado: Analysis of the 30 years Boulder record. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 116(D2).
- Huws, S.A., Edwards, J.E., Creevey, C.J., Rees Stevens, P., Lin, W., Girdwood, S.E., ... & Kingston-Smith, A.H. 2016. Temporal dynamics of the metabolically active rumen bacteria colonizing fresh perennial ryegrass. *FEMS microbiology ecology*, 92(1), fiv137.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), SEMARNAT. 2018. Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero 1990-2015.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. Hayama, Japan: Institute for Global Environmental Strategies (IGES).
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2013. Summary for Policymakers. In: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of working group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker TF, Qin D, Plattner G-K et al (eds) Cambridge University Press, Cambridge/New York.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2013: Glosario [Planton, S. (ed.)]. En: *Cambio Climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos de América.
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal*, 7(6), 1069-1079.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160(1), 1-22.
- Janssen, P. H., & Kirs, M. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3619-3625.
- Jayanegara, A., Sarwono, K. A., Kondo, M., Matsui, H., Ridla, M., Laconi, E. B., & Nahrowi. 2018. Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants: a meta-analysis. *Italian Journal of Animal Science*, 17(3), 650-656.
- Jenkins, T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of dairy science*, 76 (12), 3851-3863.
- Jenkins, T.C., Palmquist, D.L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 67 (5), 978-986.
- Johnson, K., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., & Zimmerman, P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental science & technology*, 28(2), 359-362.
- Johnson, K.A., and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2483-2492.
- Johnson, K.A., Kincaid, R.L., Westberg, H.H., Gaskins, C.T., Lamb, B.K., & Cronrath, J.D. 2002. The effect of oilseeds in diets of lactating cows on milk production and methane emissions. *Journal of dairy science*, 85(6), 1509-1515.
- Jonker, A., and G.C. Waghorn. 2020. Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants. MPI Technical Paper. No. 2020/06. *New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand*. p. 86.

- Kaewpila, C., and Sommart, K. 2016. Development of methane conversion factor models for Zebu beef cattle fed low-quality crop residues and by-products in tropical regions. *Ecology and evolution*, 6(20), 7422-7432.
- Kebreab, E., Bannink, A., Pressman, E. M., Walker, N., Karagiannis, A., van Gastelen, S., & Dijkstra, J. 2022. A meta-analysis of effects of 3-nitrooxypropanol on methane production, yield, and intensity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*.
- Kennedy, P.M., Charmley, E. 2012. Methane yields from Brahman cattle fed tropical grasses and legumes. *Animal Production Science*, 52 (4), 225-239.
- Kim, H., Lee, H.G., Baek, Y.C., Lee, S., & Seo, J. 2020. The effects of dietary supplementation with 3-nitrooxypropanol on enteric methane emissions, rumen fermentation, and production performance in ruminants: a meta-analysis. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(1), 31.
- King, K.R., Stockdale, C.R.; Trigg, T.E. 1990. Influence of high energy supplements containing fatty acids on the productivity of pasture-fed dairy cows. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30 (1), 11-16.
- Kinley, R.D., Martinez-Fernandez, G., Matthews, M.K., de Nys, R., Magnusson, M., & Tomkins, N.W. 2020. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner production*, 259, 120836.
- Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A.; Weiss, W.P., Tricarico, J.M. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of dairy science*, 97 (6), 3231-3261.
- Koike, S., & Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS microbiology letters*, 204(2), 361-366.
- Kong, Y., Xia, Y., Seviour, R., Forster, R., & McAllister, T.A. 2013. Biodiversity and composition of methanogenic populations in the rumen of cows fed alfalfa hay or triticale straw. *FEMS microbiology ecology*, 84(2), 302-315.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., & McSweeney, C.S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS microbiology reviews*, 27(5), 663-693.
- Krause, D.O., Nagaraja, T.G., Wright, A.D.G., & Callaway, T.R. 2013. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *Journal of animal science*, 91(1), 331-341.
- Kumar, S., Choudhury, P.K., Carro, M.D., Griffith, G.W., Dagar, S.S., Puniya, M., Sirohi, S.K. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (1), 31-44.
- Ku-Vera, J.C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S.S., Montoya-Flores, M.D., Molina-Botero, I.C., Arango, J., ... & Solorio-Sánchez, F.J. 2020. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 584.
- Lassey, K.R. 2007. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agricultural and forest meteorology*, 142(2-4), 120-132.
- Lassey, K.R., Pinares-Patiño, C.S., Martin, R.J., Molano, G., & McMillan, A.M.S. 2011. Enteric methane emission rates determined by the SF6 tracer technique: Temporal patterns and averaging periods. *Animal feed science and technology*, 166, 183-191.

- Lean, I.J., Golder, H.M., Grant, T.M., & Moate, P.J. 2021. A meta-analysis of effects of dietary seaweed on beef and dairy cattle performance and methane yield. *PLoS One*, 16(7), e0249053.
- Lee, C., Araujo, R.C., Koenig, K.M., & Beauchemin, K.A. 2017. Effects of encapsulated nitrate on growth performance, nitrate toxicity, and enteric methane emissions in beef steers: backgrounding phase. *Journal of animal science*, 95(8), 3700-3711.
- Lelieveld, J., Butler, T.M., Crowley, J.N., Dillon, T.J., Fischer, H., Ganzeveld, L., ... & Williams, J. 2008. Atmospheric oxidation capacity sustained by a tropical forest. *Nature*, 452(7188), 737-740.
- Lennan, M., & Morgera, E. 2022. The Glasgow Climate Conference (COP26). *The International Journal of Marine and Coastal Law*, 37(1), 137-151.
- Leone, A., Spada A.; Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. 2016. "Moringa oleifera Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health" *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 12: 2141.
- Lester, D., & Greenberg, L.A. 1950. The toxicity of sulfur hexafluoride. *Arch. Indust. Hyg. & Occupational Med.*, 2(3), 348-9.
- Li, F., Hitch, T.C., Chen, Y., Creevey, C.J., & Guan, L.L. 2019a. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, 7(1), 1-21.
- Li, F., Li, C., Chen, Y., Liu, J., Zhang, C., Irving, B., ... & Guan, L.L. 2019b. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. *Microbiome*, 7, 1-17.
- Lines, D., Goopy, J.P., & Nolan, J.V. 2010. How often do we need to measure methane production in ruminants to establish robust phenotype?. In *Proceedings of the Australian Society of Animal Production 28th Biennial Conference*. ASAP: Australian Society of Animal Production.
- Liu, Z., Wang, K., Nan, X., Cai, M., Yang, L., Xiong, B., & Zhao, Y. 2022. Synergistic effects of 3-nitrooxypropanol with fumarate in the regulation of propionate formation and methanogenesis in dairy cows in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6), e01908-21.
- Løvendahl, P., Difford, G.F., Li, B., Chagunda, M.G.G., Huhtanen, P., Lidauer, M.H., ... & Lund, P. 2018. Selecting for improved feed efficiency and reduced methane emissions in dairy cattle. *Animal*, 12(s2), s336-s349.
- Lyons, T., Boland, T., Storey, S., & Doyle, E. 2017. Linseed oil supplementation of lambs' diet in early life leads to persistent changes in rumen microbiome structure. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1656.
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N.A., Kinley, R., de Nys, R., & Tomkins, N. 2016. Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3117-3126.
- Machmüller, A., Dohme, F., Soliva, C.R., Wanner, M., Kreuzer, M. 2001. Diet composition affects the level of ruminal methane suppression by medium-chain fatty acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52 (7), 713-722.
- Machmüller, A., Kreuzer, M. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 79 (1), 65-72.

- Machmüller, A., Soliva, C.R., & Kreuzer, M. 2003. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *British Journal of Nutrition*, 90(3), 529-540.
- Makkar, H. P. S., Vercoe, P. 2007. Measuring methane production from ruminants. Joint FAO/IEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture, International Atomic Energy, Vienna-Austria, pp 1-137.
- Manzanilla-Pech, C. I. V., Gordo, D. M., Difford, G. F., Pryce, J. E., Schenkel, F., Wegmann, S., ... & Lassen, J. 2021. Breeding for reduced methane emission and feed-efficient Holstein cows: An international response. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8983-9001.
- Marounek, M., & Dušková, D. 1999. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 429-433.
- Martin, C., Morgavi, D.P., & Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4(3), 351-365.
- Martin, C.; Ferlay, A., Mosoni, P., Rochette, Y., Chilliard, Y., Doreau, M. 2016. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *Journal of Dairy Science*, 99 (5), 3445-3456.
- Mata, L., Gaspar, H., Justino, F., & Santos, R. 2011. Effects of hydrogen peroxide on the content of major volatile halogenated compounds in the red alga *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of applied phycology*, 23, 827-832.
- Mata, L., Lawton, R. J., Magnusson, M., Andreakis, N., de Nys, R., & Paul, N. A. 2017. Within-species and temperature-related variation in the growth and natural products of the red alga *Asparagopsis taxiformis*. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1437-1447.
- Mayorga, O.L., Kingston-Smith, A.H., Kim, E.J., Allison, G.G., Wilkinson, T.J., Hegarty, M.J., ... & Huws, S.A. 2016. Temporal metagenomic and metabolomic characterization of fresh perennial ryegrass degradation by rumen bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1854.
- McAllister, T.A., & Newbold, C.J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 7-13.
- McGeough, E.J., O'kiely, P., Hart, K.J., Moloney, A.P., Boland, T.M., Kenny, D.A. 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *Journal of Animal Science*, 88 (8), 2703-2716.
- McGeough, E.J., Passetti, L.C.G., Chung, Y.H., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Harstad, O.M., ... & McAllister, T.A. 2019. Methane emissions, feed intake, and total tract digestibility in lambs fed diets differing in fat content and fibre digestibility. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(4), 858-866.
- McGinn, S.M., Flesch, T.K., Beauchemin, K.A., Shreck, A., & Kindermann, M. 2019. Micrometeorological Methods for Measuring Methane Emission Reduction at Beef Cattle Feedlots: Evaluation of 3-Nitrooxypropanol Feed Additive. *Journal of environmental quality*, 48(5), 1454-1461.
- McGinn, S.M., Turner, D., Tomkins, N., Charmley, E., Bishop-Hurley, G., Chen, D. 2011. Methane emissions from grazing cattle using point-source dispersion. *Journal of environmental Quality*, 40 (1), 22-27.
- McGuffey, R. K., Richardson, L. F., & Wilkinson, J. I. D. 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *Journal of Dairy Science*, 84, E194-E203.
- McNeely, K., Xu, Y., Bennette, N., Bryant, D.A., & Dismukes, G.C. 2010. Redirecting reductant flux into hydrogen production via metabolic engineering of fermentative carbon

- metabolism in a cyanobacterium. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 5032-5038.
- Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Pryce, J.E., Hayes, B.J., Jacobs, J.L., Wales, W.J. 2016. Reducing the carbon footprint of Australian milk production by mitigation of enteric methane emissions. *Animal Production Science*, 56 (7), 1017-1034.
- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Grainger, C., Hannah, M.C., Ponnampalam, E.N.; Eckard, R.J. 2011. Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 254-264.
- Mohammed, R., Zhou, M., Koenig, K.M., Beauchemin, K.A., & Guan, L.L. 2011. Evaluation of rumen methanogen diversity in cattle fed diets containing dry corn distillers grains and condensed tannins using PCR-DGGE and qRT-PCR analyses. *Animal feed science and technology*, 166, 122-131.
- Moore, J.E., 1980. Forage crops. In: Hoveland, C.S. (Ed.), *Crop Quality, Storage, and Utilization*. Crop Science Society of America, Madison. 348pp.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C.J. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024-1036.
- Mosier, A.R., Duxbury, J.M., Freney, J.R., Heinemeyer, O., Minami, K., & Johnson, D.E. 1998. Mitigating agricultural emissions of methane. *Climatic Change*, 40(1), 39-80.
- Moss, A.R., Jouany, J.P., & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*, 49(3), 231-253.
- Moumen, A., Azizi, G., Chekroun, K.B., Baghour, M. 2016. The effects of livestock methane emission on the global warming: a review. *Int. J. Global Warming*, Vol. 9 (2) 229-253.
- Muizelaar, W., Groot, M., van Duinkerken, G., Peters, R., & Dijkstra, J. 2021. Safety and transfer study: Transfer of bromoform present in *Asparagopsis taxiformis* to milk and urine of lactating dairy cows. *Foods*, 10(3), 584.
- Muñoz, C.; Sánchez, R.; Peralta, A.M.T.; Espíndola, S.; Yan, T.; Morales, R.; Ungerfeld, E.M. 2019. Effects of feeding unprocessed oilseeds on methane emission, nitrogen utilization efficiency and milk fatty acid profile of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 249, 18-30.
- National Academies of Science, Engineering, and Medicine (NASEM). 2016. *Nutrient Requirements of Beef Cattle, Eight Revised Edition*, Washington, D.CX. The National Academics Press. Washington.
- Niu, Q., Li, P., Hao, S., Zhang, Y., Kim, S.W., Li, H., ... & Huang, R. 2015. Dynamic distribution of the gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs. *Scientific reports*, 5(1), 1-7.
- Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., ... & Moore, S.S. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of animal science*, 84(1), 145-153.
- Nogueira, R.G.S., Perna Junior, F., Pereira, A.S.C., Cassiano, E.C.O., Carvalho, R.F., Rodrigues, P.H.M. 2020. Methane mitigation and ruminal fermentation changes in cows fed cottonseed and vitamin E. *Scientia Agricola*, 77 (6), 1-10.
- Okpara, M.O. 2018. Methane Emissions in Ruminants: Perspectives on Measurement and Estimation Methods. *Russian Agricultural Sciences*, 44, 290-294.

- Oliveira, D.E., Medeiros, S.R., Tedeschi, L.O., Aroeira, L.J.M., Silva, S.C. 2007. Estimating forage intake of lactating dual-purpose cows using chromium oxide and n-alkanes as external markers. *Scientia Agricola*, 64 (2), 103-110.
- Omontese, B.O., Sharma, A.K., Davison, S., Jacobson, E., DiConstanzo, A., Webb, M. J., & Gomez, A. 2022. Microbiome network traits in the rumen predict average daily gain in beef cattle under different backgrounding systems. *Animal Microbiome*, 4(1), 25.
- Onetti, S.G., Shaver, R.D., McGuire, M.A. 2001. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science*. 84:2751-2759.
- Onime, L., Zanfi, C., Agostinis, C., Bulla, R., & Spanghero, M. 2013. The use of quantitative real time polymerase chain reaction to quantify some rumen bacterial strains in an *in vitro* rumen system. *Italian Journal of Animal Science*, 12(3), e58.
- Pal, U.S., Patra, R.K., Sahoo, N.R., Bakhara, C.K., & Panda, M.K. 2015. Effect of refining on quality and composition of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4613–4618.
- Paterson, J.A., Belyea, R.L., Bowman, J.P., Kerley, M.S., & Williams, J.E. 1994. The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant animal intake and performance. *Forage quality, evaluation, and utilization*, 59-114.
- Patra, A.K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livestock Science* 155, 244-254.
- Patra, A.K. 2016. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Frontiers in veterinary science*, 3, 39.
- Patra, A.K., & Saxena, J. 2009a. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 363-375.
- Patra, A.K., & Saxena, J. 2009b. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition research reviews*, 22(2), 204-219.
- Patra, A.K., 2017. Prediction of enteric methane emission from cattle using linear and non-linear statistical models in tropical production systems. Mitigation and adaptation strategies for global change, 22(4), pp.629-650.
- Paul, N.A., Cole, L., De Nys, R., & Steinberg, P.D. 2006. Ultrastructure of the gland cells of the red alga *asparagopsis armata* (bonnemaisoniaceae) 1. *Journal of Phycology*, 42(3), 637-645.
- Pavan, E., Duckett, S.K., Andrae, J.G. 2007. Corn oil supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue. I. Effects on *in vivo* digestibility, performance, and carcass traits. *Journal of animal science*, 85 (5), 1330-1339.
- Paz, H.A., Anderson, C.L., Muller, M.J., Kononoff, P.J., & Fernando, S.C. 2016. Rumen bacterial community composition in Holstein and Jersey cows is different under same dietary condition and is not affected by sampling method. *Frontiers in microbiology*, 7, 1206.
- Peters, G.P., & Hertwich, E.G. 2008. Post-Kyoto greenhouse gas inventories: production versus consumption. *Climatic Change*, 86(1-2), 51-66.
- Pinares-Patiño, C., Gere, J., Williams, K., Gratton, R., Juliarena, P., Molano, G., ... & Koolgaard, J. 2012. Extending the Collection Duration of Breath Samples for Enteric Methane Emission Estimation Using the SF6 Tracer. *Animals*, 2, 275-28.

- Piñares-Patiño, C.S., Franco, F.E., Molano, G., Kjestrup, H., Sandoval, E., MacLean, S., Laubach, J. 2016. Feed intake and methane emissions from cattle grazing pasture sprayed with canola oil. *Livestock Science*, 184, 7-12.
- Poppi, D.P., McLennan, S.R., Bediye, S., de Vega, A., Zorrilla-Rios, J., 1997. Forage quality: strategies for increasing nutritive value of forages. In: Proceedings of the 18th International Grassland Congress. Winnipeg, Manitoba, Canada, 307–322.
- Poulsen, M., Schwab, C., Borg Jensen, B., Engberg, R.M., Spang, A., Canibe, N., ... & Urich, T. 2013. Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nature communications*, 4(1), 1-9.
- Qin, C., Bu, D., Sun, P., Zhao, X., Zhang, P., & Wang, J. 2017. Effects of corn straw or mixed forage diet on rumen fermentation parameters of lactating cows using a wireless data logger. *Animal Science Journal*, 88(2), 259-266.
- Rabiee, A. R., Breinhild, K., Scott, W., Golder, H.M., Block, E., & Lean, I.J. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of dairy science*, 95(6), 3225-3247.
- Ramírez, J.F., Ochoa, S.P., & Solano, R.N. 2014. Ruminal methanogenesis and mitigation strategies. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 9(2), 307-323.
- Reid, C.S.W., 1959. The treatment and prevention of bloat with anti-foaming agents. *Proc. Nutr. Soc.* 18, 127-130.
- Relling, A.E., & Mattioli, G.A. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. *Argentina: UNLP Editorial Edulp*, 23-55.
- Reynolds, C.K., Humphries, D.J., Kirton, P., Kindermann, M., Duval, S., & Steinberg, W. 2014. Effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(6), 3777-3789.
- Ribeiro Junior, C.S., Messana, J.D., Granja-Salcedo, Y.T., Canesin, R.C., Fiorentini, G., San Vito, E., ... & Berchielli, T.T. 2016. Parameters of fermentation and rumen microbiota of Nelore steers fed with different proportions of concentrate in fresh sugarcane containing diets. *Archives of Animal Nutrition*, 70(5), 402-415.
- Rigby, M., Mühle, J., Miller, B.R., Prinn, R.G., Krummel, P.B., Steele, L.P., ... & Elkins, J.W. 2010. History of atmospheric SF 6 from 1973 to 2008. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10(21), 10305-10320.
- Rivera-Villegas, A., Estrada-Angulo, A., Castro-Pérez, B.I., Urías-Estrada, J.D., Ríos-Rincón, F.G., Rodríguez-Cordero, D.; Barreras, A., Plasencia, A., González-Viscarra, V.M., Sosa-Gordillo, J.F., Zinn, R. A. 2019. Comparative evaluation of supplemental zilpaterol hydrochloride sources on growth performance, dietary energetics and carcass characteristics of finishing lambs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(2), 209.
- Roche, R., Dewhurst, R.J., Duthie, C.A., Rooke, J.A., McKain, N., Ross, D.W., ... & Wallace, R.J. 2016. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS genetics*, 12(2), e1005846.
- Romero-Pérez, A., & Beauchemin, K.A. 2018. The use of enzymatic inhibitors of methanogenesis in ruminants. *Agroproductividad*, 11(2), 16-21.
- Romero-Perez, A., Okine, E.K., McGinn, S.M., Guan, L.L., Oba, M., Duval, S.M., ... & Beauchemin, K.A. 2014. The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *Journal of animal science*, 92(10), 4682-4693.

- Rooke, J.A., Wallace, R.J., Duthie, C.A., McKain, N., de Souza, S.M., Hyslop, J.J., ... & Roehe, R. 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *British Journal of Nutrition*, 112(3), 398-407.
- Roque, B.M., Salwen, J.K., Kinley, R., & Kebreab, E. 2019. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *Journal of Cleaner Production*, 234, 132-138.
- Ruppel, C.D., & Kessler, J.D. 2017. The interaction of climate change and methane hydrates. *Reviews of Geophysics*, 55(1), 126-168.
- Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Pérez-Cruz, C., Pichardo-Ontiveros, E., Wang, M., Donovan, S. M., ... & Torres, N. 2017. Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.
- Schneider, B.H., Flatt, W.P. 1975. *The evaluation of feeds through digestibility experiments*. University of Georgia Press.
- Singh, K.M., Pandya, P.R., Tripathi, A.K., Patel, G.R., Parnerkar, S., Kothari, R.K., & Joshi, C.G. 2014. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta gene*, 2, 191-199.
- Smith, P.E., Waters, S.M., Kenny, D.A., Boland, T.M., Heffernan, J., & Kelly, A.K. 2020. Replacing barley and soybean meal with by-products, in a pasture based diet, alters daily methane output and the rumen microbial community in vitro using the Rumen Simulation Technique (RUSITEC). *Frontiers in Microbiology*, 11, 1614.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K., ... & Miller, H. 2007. IPCC fourth assessment report (AR4). *Climate change*, 374.
- Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Lucas, R. C., & Abdalla, A.L. 2017. Potential of mimosine of *Leucaena leucocephala* for modulating ruminal nutrient degradability and methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 223, 30-41.
- SRE, Secretaria de Relaciones, Gobierno de México. 2022. The Mexican delegation concludes its participation at COP26, Foreign Affairs-Environment Joint Press Release, Secretaría de Relaciones Exteriores November 14, 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/sre/prensa/the-mexican-delegation-concludes-its-participation-at-cop26?idiom=en>, ultima vista 22/02/23.
- Statistical Analysis System (SAS), Institute. 1999. The SAS system for Windows.
- Stefenoni, H.A., Räisänen, S.E., Cueva, S.F., Wasson, D.E., Lage, C.F.A., Melgar, A., ... & Hristov, A.N. 2021. Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. *Journal of dairy science*, 104(4), 4157-4173.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T.D., Castel, V., Rosales, M., Rosales, M., & de Haan, C. 2006. *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. Food & Agriculture Org.
- Storm, I.M., Hellwing, A.L.F., Nielsen, N.I., & Madsen, J. 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals*, 2(2), 160-183.
- Štreimikienė, D. 2013. The 18th session of the conference of the parties to the United Nations convention on climate change (UNFCCC). *Intelektinė ekonomika*, 7(2), 254-259.
- Subharat, S., Shu, D., Zheng, T., Buddle, B.M., Janssen, P.H., Luo, D., & Wedlock, D.N. 2015. Vaccination of cattle with a methanogen protein produces specific antibodies in the saliva

- which are stable in the rumen. *Veterinary immunology and immunopathology*, 164(3-4), 201-207.
- Tan, R.S., Zhou, M., & Li, F. 2021. Identifying active rumen epithelial associated bacteria and archaea in beef cattle divergent in feed efficiency using total RNA-seq. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100064.
- Tedeschi, L.O., Abdalla, A.L., Álvarez, C., Anuga, S.W., Arango, J., Beauchemin, K.A., ... & Kebreab, E. 2022. Quantification of methane emitted by ruminants: A review of methods. *Journal of Animal Science*, 100(7), skac197.
- Tee, T.P., Goh, Y.M., Zainudin, M.H.M., Candyrine, S.C.L., Sommart, K., Kongphitee, K., ... and Liang, J.B. 2022. Enteric methane emission models for diverse beef cattle feeding systems in South-east Asia: A meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 294, 115474.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., & Shima, S. 2010. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annual review of biochemistry*, 79, 507-536.
- Tremblay, F.J.B., & Massé, D.I. 2008. Instrumentation for precise quantification of methane emissions from dairy herds. *Canadian Biosystems Engineering*, 50.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Loor, J.J., Chilliard, Y., Doreau, M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*, 86 (12), 3999-4007.
- UNFCCC (UN Framework Convention on Climate Change). 2021. Outcomes of the Glasgow Climate Change Conference-Advance Unedited Versions (AUVs).
- Vaidya, J.D., Van den Bogert, B., Edwards, J.E., Boekhorst, J., Van Gastelen, S., Saccenti, E., ... & Smidt, H. 2018. The effect of DNA extraction methods on observed microbial communities from fibrous and liquid rumen fractions of dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 9, 92.
- Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*. 74: 3583-3597.
- Van Zijderveld, S.M., Gerrits, W. J.J., Dijkstra, J., Newbold, J.R., Hulshof, R.B.A., & Perdok, H.B. 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(8), 4028-4038.
- Varón, L.E.S. 2015. Las dietas en las emisiones de metano durante el proceso de rumia en sistemas de producción bovina. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)*, 2(1), 55-64.
- Vasta, V., Daghighi, M., Cappucci, A., Buccioni, A., Serra, A., Viti, C., Mele, M. 2019. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*, 102 (5), 3781-3804.
- Vazquez, O.P., & Smith, T.R. 2000. Factors affecting pasture intake and total dry matter intake in grazing dairy cows. *Journal of dairy science*, 83(10), 2301-2309.
- Veneman, J.B., Muetzel, S., Hart, K.J., Faulkner, C.L., Moorby, J.M., Perdok, H.B., & Newbold, C.J. 2015. Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows?. *PloS one*, 10(10).
- Waghorn, G.C., Clark, H., Taufa, V., & Cavanagh, A. 2008. Monensin controlled-release capsules for methane mitigation in pasture-fed dairy cows. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 65-68.

- Wedlock, D.N., Janssen, P.H., Leahy, S.C., Shu, D., & Buddle, B.M. 2013. Progress in the development of vaccines against rumen methanogens. *Animal*, 7, 244-252.
- Wedlock, D.N., Pedersen, G., Denis, M., Dey, D., Janssen, P.H., & Buddle, B.M. 2010. Development of a vaccine to mitigate greenhouse gas emissions in agriculture: vaccination of sheep with methanogen fractions induces antibodies that block methane production in vitro. *New Zealand Veterinary Journal*, 58(1), 29-36.
- Williams, C.H., David, D.J., Iismaa, O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *The Journal of Agricultural Science*, 59 (3), 381-385.
- Williams, Y.J., Popovski, S., Rea, S.M., Skillman, L.C., Toovey, A.F., Northwood, K.S., & Wright, A.D.G. 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Applied and environmental microbiology*, 75(7), 1860-1866.
- Wilson, K., 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 2, Unit 2.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.
- Wood, J.M., Kennedy, F.S., & Wolfe, R.S. 1968. Reaction of multihalogenated hydrocarbons with free and bound reduced vitamin B12. *Biochemistry*, 7(5), 1707-1713.
- Woodward, S.L. 2006. Supplementing dairy cows with oils to improve performance and reduce methane-does it work? In: *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*. (New Zealand Society of Animal Production). Vol. 66, p. 176.
- Wright, A.D.G., Auckland, C.H., & Lynn, D.H. 2007. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4206-4210.
- Wright, A.D.G., Kennedy, P., O'neill, C.J., Toovey, A.F., Popovski, S., Rea, S.M., ... & Klein, L. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine*, 22(29-30), 3976-3985.
- Wu, D.; Xu, L., Tang, S., Guan, L., He, Z., Guan, Y., ... Wang, M. 2016. Influence of oleic acid on rumen fermentation and fatty acid formation *in vitro*. *PloS one*, 11 (6), e0156835.
- Xue, B., Yan, T., Ferris, C. F., & Mayne, C. S. 2011. Milk production and energy efficiency of Holstein and Jersey-Holstein crossbred dairy cows offered diets containing grass silage. *Journal of dairy science*, 94(3), 1455-1464.
- Yanza, Y.R., Szumacher-Strabel, M., Jayanegara, A., Kasenta, A.M., Gao, M., Huang, H., ... & Cieślak, A. 2021. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation *in vitro* and *in vivo*: A meta-analysis. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 105(5), 874-889.
- Yu, G., Beauchemin, K.A., & Dong, R. 2021. A review of 3-Nitrooxypropanol for enteric methane mitigation from ruminant livestock. *Animals*, 11(12), 3540.
- Zeitz, J.O., Kreuzer, M., Soliva, C.R. 2013. *In vitro* methane formation and carbohydrate fermentation by rumen microbes as influenced by selected rumen ciliate species. *European journal of protistology*, 49 (3), 389-399.
- Zhang, L., Huang, X., Xue, B., Peng, Q., Wang, Z., Yan, T., & Wang, L. 2015. Immunization against rumen methanogenesis by vaccination with a new recombinant protein. *PLoS One*, 10(10), e0140086.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., & Guan, L.L. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 3776-3786.

- Zimmerman, P.R. 1993. *U.S. Patent No. 5,265,618*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Zinn, R.A., Jorquera, A.P. 2007. Feed value of supplemental fats used in feedlot cattle diets. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23 (2), 247-268.



Effect of canola oil supplementation level on total tract digestion, ruminal fermentation, and methane emissions of cows grazing *Urochloa* sp. supplemented with a fixed amount of concentrate

Jonathan Noe Avilés-Nieto¹ · Claudia Cecilia Márquez-Mota¹ · Juan Hebert Hernández-Medrano² · Jacinto Efrén Ramírez-Bribiesca³ · Epigmenio Castillo-Gallegos⁴ · Alejandro Plascencia⁵ · Francisco Alejandro Castrejón-Pineda¹ · Luis Corona¹

Received: 28 January 2022 / Accepted: 23 January 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Four rumen-cannulated cows (*Bos taurus* × *Bos indicus*, 657 ± 92 kg body weight, BW) in a rotational grazing (*Urochloa* sp.) system were assigned to different canola oil (CO) inclusion levels, 0.0, 0.40, 0.80, and 1.2 g/kg according to shrunk body weight (SBW, BW adjusted for gastrointestinal filling) in a 4 × 4 Latin Square design to evaluate CO on the CH₄ emissions and dietary energy intake. CH₄ emissions were estimated using an infrared analyzer methodology (*Sniffer* method). Grass intake and fecal production were estimated using Cr₂O₃ as an external marker. CO supplementation increased (linear effect, $P \leq 0.05$) total dry matter and gross energy intake with a linear increase ($P = 0.09$) in neutral detergent fiber (NDF) intake. While digestible energy (Mcal/kg) linearly increased with increasing CO supplementation level (linear effect, $P < 0.05$), total tract digestion of organic matter, NDF, and CP was comparable ($P > 0.05$) between levels. Maximal CO supplementation (1.2 g/kg SBW) significantly decreased total ruminal protozoa population, acetate:propionate ratio, and enteric methane production (g/kg DMI) by 9, 5.3, and 17.5%, respectively. This study showed that, for cows grazing tropical forages, CO can be supplemented up to 1.2 g/kg SBW (5.8% of the total diet) without negatively affecting intake and nutrient digestion while reducing ruminal fermentation efficiency and enteric methane emission ($\leq 17.5\%$).

Keywords Methane · Canola oil · Cattle · Grazing · Digestion

Introduction

Livestock is among the highest contributors to greenhouse gas (GHG) emissions, mainly methane (CH₄) globally, with extensive grazing production systems having the highest emissions (Hristov et al., 2013a; Herrero et al., 2016).

The CH₄ emission represents a significant loss of energy intake (Audsley and Wilkinson, 2014; Hristov et al., 2015). Therefore, the challenge is to develop diets and strategies to reduce CH₄ emission by optimizing energy use in ruminant diets, consequently improving productive performance and reducing their environmental impact (i.e., global warming; McGeough et al., 2010; Wu et al., 2016).

Previous reports have pointed out to the addition of lipids to reduce CH₄ emissions in ruminants (Grainger and Beauchemin, 2011; Hristov et al., 2013b; Knapp et al., 2014; Martín et al., 2016). Unsaturated fatty acids (UFA) decrease CH₄ emission by increasing propionic acid production and decreasing protozoa population and UFA hydrogenation

✉ Luis Corona
gochi@unam.mx

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

² Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

³ Departamento de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, México

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Centro de Enseñanza, Investigación Y Extensión en Ganadería Tropical, Universidad Nacional Autónoma de México, Veracruz, México

⁵ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, México

(Bonilla and Lemus, 2012; Mata e Silva et al., 2017). These effects have been observed using long-chain (C18) UFAs (i.e., vegetable and fish oils; oleic (C18:1) and linoleic (C18:2)) and medium chain fatty acids (Patra, 2013; Yanza et al., 2021). Studies using CO supplementation in grazing cattle (46 g/kg CO sprayed onto *Lolium perenne* meadow grass; Piñares-Patiño et al., 2016) and a barley silage diet (75% of DMI with 4.6% CO; equivalent to 1.2 g oil/kg SBW; Beauchemin and McGinn, 2006) resulted in a decrease of 11% and 32% CH₄ emissions, respectively. Moreover, in grazing cattle, there was a decrease in ruminal acetate:propionate ratio (Piñares-Patiño et al., 2016). It was suggested that the reduction in CH₄ may be due to a decrease in feed intake and total DM digestibility of the tract as a direct consequence of the decrease in dNDF. The effects of oil supplementation have been reported primarily under temperate climate conditions with scarce reports for cattle under tropical grazing conditions.

Tropical pastures have low dNDF, nitrogen (N), and energy concentration which have a detrimental effect on N utilization efficiency and carbon retention, causing an increase in the production of enteric CH₄ in cattle grazed in tropical grazing systems. To reduce enteric CH₄ emissions significantly in these conditions, a suitable GHG mitigation strategy is the use of concentrates supplemented with adequate amounts of vegetable oils to increase energy intake but with a minimal impact on forage dNDF. Mata e Silva et al. (2017) reported a 23% reduction in CH₄ emissions in dairy cows (Holstein × Gyr) grazing *Urochloa* sp. and supplemented with 2.86 kg/day concentrate and 13.4% sunflower oil (0.73 g of oil/kg of body weight). However, these authors did not consider ruminal fermentation variables in their study. It is important to point out that oil supplementation at high levels in grazing cattle should be used carefully due to possible detrimental effects on ruminal digestible NDF (dNDF; Jenkins and Palmquist, 1984), low intestinal digestibility, and energy value of lipids (Zinn and Jorquera, 2007).

In beef cattle, optimal FA digestibility is limited to a maximum lipid intake of 0.96 g/kg body weight (BW), representing an adequate value of energy in fat (Zinn and Jorquera, 2007). However, other studies have observed similar effects on CH₄ at lower oils supplementation levels (~0.73 g/kg BW; Mata e Silva et al., 2017). Consequently, it is necessary to determine the optimal level of vegetable oil inclusion to reduce CH₄ emissions without decreasing dry matter intake (DMI) and dietary energy use in grazing cattle under tropical conditions. In this context, this study aimed to evaluate the effect of the inclusion level of CO on nutrient digestibility, ruminal fermentation, and enteric CH₄ emissions in grazing cattle under tropical conditions supplemented with a fixed amount of commercial concentrate.

Materials and methods

Location

The study was carried out at the Center for Teaching, Research and Extension in Tropical Livestock (CEIEGT, FMVZ-UNAM), located in Tlapacoyan, Veracruz, Mexico (20°03'N and 93°03'W). The climate is warm humid, Af (m) w*(e) (García, 2004), with an average daily temperature of 23.9 ± 0.5 °C and an average annual rainfall of 1931 ± 334 mm.

Animals, feeding, and experimental design

Four non-pregnant, non-lactating rumen-cannulated adult crossbred cows (*Bos taurus* × *Bos indicus*) with an average shrunk body weight (SBW; BW adjusted for gastrointestinal filling) of 631 ± 88 kg were used in the study. At the start of the experiment, cows were weighed for three consecutive days at 1100 h. The SBW was obtained by multiplying BW by a correction factor of 0.96 to account for intestinal filling, according to the National Academies of Sciences, Engineering and Medicine (NASEM, 2016), and used previous studies (Cannas et al., 2004; Estrada-Angulo et al., 2018; Rivera-Villegas et al., 2019).

Cows were housed in 1 hectare of a *Urochloa* sp. grazing paddock, divided into four pasture sections of 50 × 50 m. Feeding was based on a rotational grazing system of 7 days per paddock, with a recovery period of 21 days, ensuring an average height of the pasture of 40 cm before grazing and 10 cm of residual. Animals received 7 kg/cow (as-fed basis) of commercial concentrate (Purina®, Puricarne sequia) daily supplemented with CO (Cristal® 99% canola oil, Aceites, Grasas y Derivados, S.A., Jalisco, Mexico) at four different levels: 0.0, 0.40, 0.80, and 1.20 g CO/kg SBW, resulting in a final concentration of 0, 40, 80, and 120 g CO/kg of concentrate (on a DM basis). The concentrate was offered in equal amounts (3.50 kg as-fed basis) at 0600 and 1500 h. The residual concentrate was introduced directly into the rumen through the ruminal cannula to ensure expected CO inclusion. The average DM content in CO-supplemented concentrate was 89.07 ± 0.7%, with an average DM intake of 6.235 kg/cow, so the total daily intake of CO was 0, 249, 499, and 748 g per animal, corresponding to 0.0, 0.40, 0.80, and 1.20 g CO/kg SBW, respectively (Zinn and Jorquera 2007; Bayat et al., 2018).

The experiment design was a Latin Square, with four periods for four treatments; where each period lasted 19 days (13 for adaptation and 6 for sampling feces and ruminal content).

Sampling

Feed

Forage samples were hand-plucked (Cook, 1964) every 7 days; when the animals changed paddock, the samples were weighed fresh and placed in a forced air oven at 65 °C until constant weight; once dry, the samples were stored until analysis in the laboratory. Forage sampling was carried out by collection samples from > 1 paddock followed by mixing and selection of a representative sample according to the percentage of time spent on these paddocks for analysis. Concentrate and forage samples were dried (60 °C for 72 h), ground, and sieved (1 mm) for further composition analysis. CO samples were stored protected from light (amber bottles) and under cool conditions (18 °C) until analysis.

To determine forage intake (and nutrient digestibility), cows received 10 g of Cr₂O₃ (68.52% purity) contained in a cellulose paper envelope and placed daily directly into the rumen through the cannula from day 8 to 17 of each period at the same time (1530 h). Individual fecal samples (200 g) were collected directly from the rectum every 8 h (3 times daily) during the last 4 days of each treatment period, as follows: d1 00:00, 08:00, and 16:00; d2 02:00, 10:00, and 18:00; d3 04:00, 12:00, and 20:00; d4 06:00, 14:00, and 22:00 h. Fecal samples were refrigerated (1–4 °C) and homogenized at the end of each sampling period to generate a 400 g composite sample which was then frozen (–18 °C) for further chemical analysis.

Ruminal liquor

Samples of ruminal liquor (200 mL) were collected on days 18 and 19 of each experimental period every 4 h. These were filtered through eight gauze layers and the pH measured using a portable potentiometer (Oakton, pHTestrs®).

For protozoa number estimation, a 5 mL of filtered ruminal fluid vial was collected and 5 mL of iodine solution added (1.5 g of potassium iodine and 0.5 g of re-sublimated iodine brought to 100 mL). Samples were stored at 1–4 °C before protozoa estimation was carried under a binocular microscope (Carl Zeiss Axiolab E re, Artisan Technology Group, Champaign, IL, USA) using a hemocytometer (Neubauer improved, Marienfeld, Germany). Six replicates of the same sample were made to estimate the number of protozoa per milliliter.

Forty milliliters of ruminal liquor (corresponding to 4-h post-feeding, i.e., 1900 h concentrate, and 0300 h forage) was collected in containers with 10 mL 25% (v/v) metaphosphoric acid and frozen (–18 °C) for ammonia–nitrogen and VFA profile determination. Ammonia–nitrogen (NH₃-N) was estimated by micro diffusion as described by Conway

and O'Malley (1942) and VFA profile was measured by gas chromatography (Perkin Elmer, AutoSystem XL model).

Methane emissions estimation

CH₄ was measured using the method described by Garnsworthy et al. (2012). Briefly, CH₄ concentrations were measured when the concentrate was offered at 0600 and 1500 h using an infrared CH₄ analyzer (0–10 ppm; Guardian Plus; Edinburgh Instruments Ltd., Livingston, UK). The sampling tube (6 mm internal diameter) was placed in the middle of the closed trough (at the height of the nose) in the form of a ring to prevent blockages. CH₄ concentration was recorded every second on a data logger (Simex SRD-99; Simex Sp. z o.o., Gdansk, Poland) and then visualized using logging software (Loggy Soft; Simex Sp. z o.o.). Feeder entry times and cow identification were recorded manually. Raw data from the logger were transformed into values for peak height (maximum minus baseline CH₄ concentration for each eructation) and area under the curve (AUC) for each peak (representing total CH₄ release per eructation). Peaks were identified and quantified and peaks' values less than 200 ppm below baseline were discarded. For each feeder entry, mean peak height and AUC were calculated, along with peak frequency (belching rate). A CH₄ emission rate (MER) during concentrate feeding (i.e., feeder entry) was calculated as the product of the maximum frequency and the maximum mean area. The CH₄ emission estimations were calculated as the average of 12 sampling events, i.e., 6 sampling days with two daily samples at 0600 and 1500 h. Methane emission was expressed as total production, g/day; CH₄ yield, g/kg DMI and g/kg of digested NFD. The methane conversion factor (extent to which feed energy is converted to CH₄, Y_m) was calculated according to IPCC Tier 2 (2006); the energy conversion from methane to flux in mass units was 55.56 MJ/kg (Lassey, 2007). As follows:

$$Y_m = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n CH_{4i}}{n}}{\frac{\sum_{i=1}^n GEI_i}{n}} \times 100$$

where Y_m, methane conversion factor (% of GE Intake); CH_{4i}, the *i*th observed methane energy emissions (MJ/day); GEI_{*i*}, the *i*th observed Gross Energy Intake (MJ/day); and *n*, number of observations (Kaewpila and Sommart, 2016). The means used for the calculation are those obtained in the experiment. Mcal was multiplied by 4182 to get MJ.

Sample analysis

Feed ingredients (CO, *Urochloa* sp., and concentrate) and faces samples were analyzed for dry matter content (DM, method 934.01; AOAC, 2015), crude protein (CP, method

2001.11; AOAC, 2015), ash (method 942.05; AOAC, 2015), neutral detergent fiber (NDF), and acid detergent fiber (ADF), as described by Van Soest et al. (1991), using alpha-amylase without correction for ash and an ANKOM 2000 analyzer, Gross Energy using the calorimetric pump approach (Parr, 6400; IL, USA).

Forage DMI was estimated (Schneider and Flatt, 1975) considering Cr_2O_3 intake/ Cr_2O_3 fecal concentration. The digestibility of *Brachiaria* sp. and concentrate samples was determined by a previously validated in vitro procedure (Goering & Van Soest, 1970). To obtain fecal output from forage, fecal production associated with concentrate and CO was discounted from the total fecal output with the Cr_2O_3 (Oliveira et al., 2007). Cr_2O_3 in fecal samples was determined using atomic absorption spectrometry following Williams et al. (1962) methodology.

Statistical analysis

Data were analyzed as a 4 × 4 Latin Square Design using the proc MIXED procedure of SAS 9.0 (Statistical Analysis System, Inc., Cary, NC, USA), according to the following model: $Y_{ijk} = \mu + H_i + C_j + T_k + e_{ijk}$, where Y_{ijk} is the dependent variable, μ is the general mean, H_i is the effect of the i th animal (row), C_j is the effect of the j th period (column), T_k is the effect of the k th CO supplementation, and e_{ijk} is the residual effect. Linear and quadratic trends in response to the level of inclusion of CO by using orthogonal polynomial contrasts (Cochran and Cox, 1992).

For ruminal fermentation parameters (VFAs, protozoa number estimation, and CH_4 emission), sampling period/time was included as a repeated measure; differences with P values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Normality of distribution and homogeneity of variance for residuals were tested using proc univariate procedure of SAS 9.0.

Results

Results for the chemical composition analysis of CO, commercial concentrate, and *Urochloa* sp. grass are shown in Table 1. Supplemental CO represented 0.0, 1.97, 4.15, and 5.81% inclusion of the total DM intake (CO supplemented concentrate + forage) for 0.0, 0.40, 0.80, and 1.20 g/kg SBW treatments, with a total fat concentration of 2.66, 4.53, 6.67, and 8.30%, respectively.

Dry matter intake and digestion

The effect of CO on feed intake, fecal excretion, and total tract digestion is shown in Table 2. The average DMI of concentrate was 5870 g/cow/day, while CO intake was 0.00, 249, 499, and 748 g. Daily forage DMI (grazing *Urochloa*

Table 1 Chemical compositions of the ingredients fed to crossbred (*Bos taurus* × *Bos indicus*) cows

Items (g/100 g of DM)	Canola oil	<i>Urochloa</i> sp.	Commercial concentrate
Crude protein	-	6.4	19.5
Ashes	-	11.1	13.7
Neutral detergent fiber	-	66.6	41.8
Acid detergent fiber	-	41.4	14.6
Crude fat	99.0	2.26	3.0
Gross energy (Mcal/kg of DM)	9.5	3.7	3.7

DM, dry matter

sp.) was not affected by treatments averaging 6030 g. As expected, intake of the CO-supplemented concentrate was comparable between treatments, and intake of CO increased linearly ($P < 0.01$) according to supplementation level. It was noted that total DMI increased as the CO supplementation increased in a linear fashion ($P = 0.02$). There were no treatment effects on organic matter (OM) or CP intake, but NDF intake tended ($P = 0.09$) to increase as CO was increased in the diet. There were no treatment effects on total tract digestion of organic matter, NDF, or CP, but digestible energy (Mcal/kg) was linearly increased with CO supplementation.

Ruminal fermentation

The effects of CO supplementation on $\text{NH}_3\text{-N}$, pH, protozoa number, and VFA are shown in Table 3. Different CO supplementation levels showed similar levels ($P > 0.05$) of ruminal N-NH_3 (25.53 and 34.37 mg/dL) and ruminal pH values (6.47 and 6.50). Total ruminal protozoa population decreased as CO supplementation increased: 29.7, 69.5, and 88.6% (linear effect $P < 0.01$) for 0.4, 0.8, and 1.2 g CO/kg SBW, respectively. This decrease was most evident in the *Entodiniidae* (31.4, 68.8, and 88.8%, respectively) and *Holotrichidae* (11.2, 77.5, and 86.4%) populations.

No differences were observed in total ruminal concentrations of VFA as well as butyric, iso-butyric, and iso-valeric acids. Furthermore, acetic acid decreased linearly ($P < 0.01$) to 7.7%, whereas propionic and valeric acids increased ($P < 0.01$) to 24.6 and 3.0%, respectively, with CO supplementation compared to the control. Consequently, the acetate:propionate ratio decreased by 10.7, 18.6, and 25.2% for the levels of 0.40, 0.80, and 1.20 g CO/kg SBW, respectively.

Methane emissions

The enteric emissions of CH_4 are shown in Table 3. Compared with the diet without canola oil supplementation (0.0 g/kg SBW), CH_4 emission rate (MER) decreased

Table 2 Dry matter intake, fecal excretion, and total tract digestion of cows fed with different levels of canola oil

Items	Canola oil g/kg SBW ¹				SEM ²	P-value ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	Q
<i>Intake</i>							
Concentrate, kg/day	6.23	5.99	5.74	5.49	0.10	0.02	0.77
Canola oil, kg/day	0	0.25	0.50	0.75	0.16	<0.01	1.00
Concentrate plus canola oil, kg/day	6.23	6.24	6.24	6.23	0.12	0.56	0.87
<i>Urochloa</i> sp., kg/day	5.34	6.37	5.78	6.62	0.29	0.11	0.81
Total DMI, kg/day	11.6	12.6	12.0	12.9	0.42	0.02	0.81
OM, kg/day	10.3	11.2	10.7	11.4	0.25	0.11	0.76
NDF, kg/day	6.47	7.13	6.81	7.45	0.21	0.09	0.97
ADF, kg/day	3.26	3.68	3.44	3.85	0.13	0.11	0.98
CP, kg/day	1.56	1.58	1.49	1.54	0.02	0.75	0.22
GE, Mcal/day	45.0	52.0	52.0	57.0	2.51	<0.01	0.78
<i>Fecal excretion</i>							
DM, kg/day	4.19	4.39	4.20	4.36	0.16	0.02	0.81
OM, kg/day	3.39	3.44	3.41	3.50	0.04	<0.01	0.13
NDF, kg/day	2.27	2.57	3.03	3.85	0.10	0.08	0.34
ADF, kg/day	1.94	2.08	1.86	2.30	0.06	0.22	0.41
CP, kg/day	0.46	0.49	0.45	0.49	0.01	0.17	0.82
GE, Mcal/day	16.4	18.9	19.3	21.1	0.84	<0.01	0.78
<i>Total tract digestion</i>							
DM, %	63.8	65.2	65.1	66.1	0.47	0.22	0.51
OM, %	66.9	69.3	68.0	69.2	0.57	0.78	0.66
NDF, %	64.6	64.0	55.5	48.3	4.02	0.06	0.58
ADF, %	40.6	44.3	45.9	40.3	1.25	0.97	0.28
CP, %	70.3	68.6	69.5	68.5	0.42	0.34	0.74
DE, %	63.5	63.7	62.8	63.1	0.21	0.67	0.98
DE, Mcal/day	28.8	32.5	32.9	36.3	1.53	<0.01	0.85
DE, Mcal/kg	2.47	2.62	2.71	2.82	0.04	<0.01	0.75

¹SBW, shrunk body weight, BW × 0.96 (NASEM, 2016); ²SEM, standard error means; ³P-value L (linear) and Q (quadratic); DMI, dry matter intake; DM, dry matter; OM, organic matter; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber; CP, nitrogen; GE, gross energy; DE, digestible energy; Mcal, megacalories; intake, was estimated based on fecal output (using Cr₂O₃ as marker)

linearly (7.6, 10.9, and 46.7%, $P < 0.05$) as the CO level in the diet increased. For CH₄ expressed in g/day, the observed decrease (linear effect, $P < 0.05$) was 1.28, 1.87, and 8.1%, whereas for CH₄ described as g/kg DMI, the reduction (linear effect, $P < 0.01$) was 9.1, 5.3, and 17.5%. Moreover, CH₄ production per kilogram of digested NDF was similar ($P > 0.05$) between treatments. For the methane conversion factor Y_m (CH₄, % GEI), a linear decrease ($P < 0.01$) of 12.1, 13, and 25.8% was observed as the CO level increased.

Discussion

This study demonstrated that increasing levels of CO supplementation to the diet of grazing beef cows did not affect digestibility or ruminal fermentations parameters but were

able to decrease CH₄ emission by up to 17.5% in animals receiving the highest CO supplementation (1.2 g CO/kg SBW). Moreover, we observed that these effects had a linear effect with no impact on DMI in animals receiving or not CO supplementation.

Chemical composition of *Urochloa* sp

The chemical composition of *Urochloa* sp. agrees with that reported in previous studies considering a similar state of maturity (Avellaneda Cevallos et al., 2008). The nutrient concentration in the commercial concentrate closely matched that specified on the label provided by the feed manufacturer.

Table 3 Effect of the inclusion of canola oil on rumen fluid ammoniacal nitrogen, pH, protozoa, volatile fatty acids, and methane

Items	Canola oil g/kg SBW ¹				SEM ²	P-value ³	
	0.00	0.40	0.80	1.20		L	Q
NH ₃ -N, mg/dL	25.5	26.7	33.0	34.4	2.23	0.27	0.99
pH	6.49	6.50	6.47	6.48	0.01	0.78	0.99
<i>Protozoa, × 10⁶ cells/mL</i>							
<i>Eutodinae</i>	1845	1265	575	207	364	< 0.01	0.05
<i>Holotrichidae</i>	167	148	37	23	37	< 0.01	0.79
Total protozoa	2012	1413	612	230	401	< 0.01	0.05
<i>Volatile fatty acids</i>							
TVFA, mM	77.5	74.5	74.3	70.7	1.39	0.18	0.92
Acetic, mol/100 mol	60.1	58.4	57.6	55.5	0.96	< 0.01	0.73
Propionic, mol/100 mol	19.1	20.9	22.6	23.8	1.30	< 0.01	0.50
Butyric, mol/100 mol	11.8	11.7	10.8	11.1	0.24	0.76	0.36
Valeric, mol/100 mol	3.32	3.33	3.44	3.42	0.03	< 0.01	0.38
Iso-butyric, mol/100 mol	2.60	2.58	2.51	2.68	0.04	0.90	0.41
Iso-valeric, mol/100 mol	2.10	2.07	2.01	2.14	0.03	0.06	0.79
A:P ⁴	3.14	2.79	2.54	2.33	0.17	< 0.01	0.47
<i>Infrared methane emissions</i>							
MER, mg/min	0.92	0.85	0.82	0.49	0.10	0.01	0.25
CH ₄ , g/day	304.8	300.9	299.1	280.1	5.51	0.01	0.25
CH ₄ , g/kg DMI	26.3	23.9	24.9	21.7	0.98	0.01	0.65
CH ₄ , g/kg DNDF	72.6	66.0	79.1	77.8	1.99	0.74	0.44
CH ₄ , % GEI (Ym)	9.03	7.94	7.86	6.70	0.48	0.01	0.88

¹SBW, shrunk body weight, BW × 0.96 (NASEM, 2016); ²SEM, standard error means; ³P-value linear and quadratic; NH₃-N, ammonia-nitrogen; TVFA, total volatile fatty acids; ⁴A:P, acetic acid to propionic acid ratio; MER, methane emission rate; CH₄, methane; DMI, dry matter intake; DNDF, digested neutral detergent fiber; GEI, gross energy intake. Ym = CH₄ energy loss, in proportion to the GEI

Intake and digestibility

Animals in this study had a fat intake of 2.66, 4.53, 6.67, and 8.30% corresponding to the CO supplementation of 0.0, 0.40, 0.80, and 1.20 g CO/kg SBW respectively. Although animals at the highest CO supplementation level had a fat intake of 8.3%, we did not observe any effect on intake. It has been indicated that lipid supplementation above 7% DM generally decrease intake due to an increase in circulating UFA that cause receptor activation in the satiety center of the hypothalamus, and a potential reduction in fiber digestibility delaying passage rate (Allen, 2000; Kumar et al., 2014). Several mechanisms can explain how dietary lipids interfere with ruminal fermentation, such as when long-chain FA (present in CO), escape biohydrogenation and are potentially toxic to bacteria responsible for fiber degradation (cellulolytic, gram +) and for methanogens and protozoa (Desbois and Smith, 2010; Zeitz et al., 2013). Furthermore, fats form a physical layer on the fiber, preventing microbial degradation, which has a detrimental effect on voluntary intake (Jenkins, 1993). However, restriction of supplemental fat levels based on percentage of inclusion in the diet of ruminants is a limited concept. Currently, a better indicator used is the total

lipid intake/kg of live weight with the recommended amount of 1 g of lipid intake/kg of weight (Zinn and Jorquera, 2007). In our experiment, the proportion of lipid intakes was 0.49, 0.91, 1.27, and 1.68 g/kg BW for supplementation levels of 0.0, 0.40, 0.80, and 1.20 g CO/kg SBW, respectively. Therefore, it was expected a potential reduction in DMI with 0.80 and 1.20 CO/kg SBW treatments.

Nonetheless, the effects of adding supplemental oils on the intake and digestibility of fresh forage-based diets have been inconsistent. Some studies on oil supplementation of forage-based diets indicate reductions in both feed intake and overall diet digestibility (Beauchemin and McGinn 2006; Pavan et al., 2007; Cosgrove et al., 2008), while other studies found no effect on intake (King et al., 1990; Woodward, 2006). In general, concentrate offer to grazing animals reduces grass intake due to a substitution effect but the total DMI increases (Vazquez and Smith, 2000). Increasing the CO supplemental level increased the DMI up to 16% at the highest level of supplementation (Table 2), increasing GE (Mcal/day) intake by up to 26%. The effect of increased DMI, observed in the present study, agrees with Pinares-Paño et al. (2016) in steers grazing temperate pastures, who reported an increase in DMI of 9.4%. In an early report, Reid

(1959) indicates that the constant addition of supplemental oil to grazed grass may not produce abrupt changes in the rumen environment and function; thus, DM intake must not be negatively affected.

The main factor that limits weight gain in adult ruminants in grazing is energy. Inclusion of oils in the diet increases energy density and total tract energy digestible because fats are highly digestible and contain more than twofold more energy than concentrates. Nutrient digestibility was not affected by the addition of CO, except for an increase in energy (Mcal/kg; $P < 0.05$) as the addition of CO increased. Ueda et al. (2003) reported that compared to un-supplemented cows, ruminal OM and fiber digestibility increased markedly with 3% LSO supplementation (equivalent to 1.55 oil/kg BW) in cows on a forage-rich diet, with no effect on total tract digestibility of OM and NDF. Thus, at equal intakes, cattle that receive supplemental oils have greater energy availability even when the digestibility of some fractions (i.e., NDF) may be affected.

Although the main objective of this experiment was to determine the role of supplemental oil on the energy intake and decrease of methane production in cattle under tropical conditions, oil supplementation in grazing cattle under tropical conditions may be cost prohibitive. However, tropical plants such as *Moringa oleifera* seed, which has up to 40% oil (Leone et al., 2016), may be an alternative for sustainable livestock production systems that allow increasing the energy intake of the diet while reducing methane emissions.

Ruminal fermentation

The values of rumen parameters are in agreement with those reported by Ribiero et al. (2016), in Nellore cattle with a diet based on sugarcane with different portions of concentrate (30 to 80) for N-NH₃ (18.7 to 30 mg/dL), pH (6.49 to 6.01), and total protozoa (2127 to 1748 10⁶/mL). The addition of FA can have a toxic effect on rumen protozoa (Machmüller and Kreuzer, 1999); according to Onetti et al. (2001), the numbers of protozoa in rumen decreased when fat was added. In the present study, the ratio of acetate:propionate decreased significantly with the addition of canola oil, which is consistent with the findings of Beauchemin and McGinn (2006) where despite this decrease in the acetate ratio and the increase in propionate, there were no found effects in the decrease of methane.

Methane emissions

Variations in the values of methane emissions among studies are mainly due to the technique used to measure methane and the chemical composition of the forage consumed. Enteric methane emission (g CH₄/kg DMI) in the control non-CO supplemented cows in this study was 26.3 g CH₄/kg DM

(range 21.7–26.3 g CH₄/kg DMI), which is close to the values determined by Kennedy and Charmley (2012) for cattle consuming pastures and tropical legumes (19.6 g/kg DMI) and by Beauchemin and McGinn (2006; 20 g CH₄/kg DMI) for cattle on a barley silage (75%) and grain diet (steam-rolled barley, 19%). However, slightly lower than the 28 g of CH₄/kg DMI reported for cattle grazing *Leucaena* (McGinn et al., 2011). It is evident that the methodology employed in this study would produce results similar to those previously reported for cattle under comparable conditions.

Estimated methane emissions in grazing cows in this study reduced linearly according to CO inclusion level in the diet, with the highest inclusion reducing nearly 17% daily methane output. Several studies have reported that lipids reduce CH₄ production in the rumen by different mechanisms (Dohme et al., 2001; Machmüller et al., 2001; Bayat et al., 2018; Muñoz et al., 2019; Nogueira et al., 2020). Similar to our findings, Moate et al. (2011) showed that lactating cows' diets (60:40 ratio of forage: concentrate) containing 51, 52, and 65 g fat/kg DM decreased emissions of CH₄ (g/day) in a linear fashion (7.6, 4.5 and 10.2%, respectively), compared to a control diet. Beauchemin et al. (2007) reported that the addition of sunflower oil, rich in linoleic acid (C18:2), was effective in reducing the emissions of CH₄ by 14% (177.4 vs. 152.7 g/day) and 11.5% (20 vs. 17.7 g/kg DMI) when added to 3.4% inclusion. A study by Woodward (2006), carried out with lactating dairy cows fed pasture forage dominated by perennial ryegrass (13.5–15.0 kg DMI/day) supplemented with 500 g of fish oil, reported a reduction (compared to the control) in the CH₄ yield of 27%. Overall, these studies show that addition of fatty acids (fats or oils) to cattle diets seems to have decreasing effect on CH₄ emissions regardless of the source and the feed that animals are offered.

In our study, the rate at which CH₄ decreased was 3.6% per each 1% oil added to the diet. Consistent with this, Martin et al. (2010) in a meta-analysis with 67 in vivo diets for sheep, beef, and dairy cattle estimated an average 3.8% decrease in enteric CH₄ (g/kg DMI) with each of 1% added fat. From a similar meta-analysis study on cattle, for each percentage increase of fats, methane emissions decline by 13.4 g/day (i.e., 3.77% compared with diets without fat) or 0.66 g/kg DMI ($n = 105$) within dietary fat concentrations of 1.24–11.4% (Patra, 2013). In a recent meta-analysis study in dairy cattle (12 studies including 362 individual measurements) under an standard TMR diet containing 30 g of lipids/kg DMI, researchers estimated that for each 1% addition of fat in the diet, methane emissions decreased by approximately 3.5% (Moate et al., 2016). Hristov et al. (2013a) consider that concentrates can influence the reduction of enteric CH₄ from 35 to 40% of inclusion, but at higher inclusion levels (> 40%), a decrease in fiber digestibility may be observed. In this trial, the decrease in

methane could partially be explained by a direct effect of oil on ruminal methanogenesis, and although there was a reduction of digestibility of ruminal NDF, this considering that oil supplementation tended ($P=0.06$) to reduce total tract NDF digestion and greater than 90% of total NDF digestion occurs in the rumen (Huhtanen et al., 2010); in this trial, the decrease in methane was not due to the amount of NDF digested (Table 3).

The decrease in methane emission is also evaluated as CH_4 energy loss, in proportion to the gross energy intake (GEI), a variable known as Y_m , which is important to determine the effect on the efficiency of energy utilization of the animal (Beauchemin et al. 2022). Enteric methane emission represents a loss of 2 to 12% of GEI (Johnson and Johnson, 1995). The IPCC (2006) (tier 2 level) use the conversion factor $Y_m=6.5\%+1\%$ of GEI for non-fodder cattle (fed concentrate diet < 90% of total intake). However, it was developed from a dataset on *Bos taurus* fed temperate. Using various studies to estimate models in tropical conditions, the average Y_m value was 5.84% ranging from 1.96 to 10.6 (Patra, 2017). Kaewpila and Sommart (2016) indicate that the value in tropical conditions is $8.4\pm 0.4\%$. Tee et al. (2022) estimated the Y_m value of 8.3%, in tropical beef cattle systems and when fed diets with higher forage content. In our study, we observed a range between 6.7 and 9.03% (average 7.9%), and it decreased to 6.7% with the highest inclusion of CO. It will be important to develop models that estimate the methane conversion factor, considering different dietary situations such as dietary lipid concentration.

We concluded that canola oil supplemented at 1.2 g CO/kg SBW (5.4%) in cows grazing tropical fodder and supplemented with a fixed amount of commercial concentrate increases the total energy intake and efficiency of rumen fermentation, thereby increase the DE value (Mcal/kg) of the diet by up to 12.4% and reducing the emission of enteric methane by up to 17.5%. Therefore, alternative sources of oil, such as tree seeds, should be sought in sustainable production systems under tropical conditions.

Acknowledgements The first author thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for granting a scholarship to carry out the Ph.D. work at the Department of Animal Nutrition and Biochemistry FMVZ-UNAM. We thank the technicians for their significant contributions, A. García-Pérez and J.M. Talamantes-Gómez (laboratory analysis).

Author contribution L.C., C.C.M.M., and A.P. conceived and design research. J.N.A.N. and E.C.G. performance research. L.C., J.N.A.N., E.C.G., and J.H.H.H. analyzed data. J.N.A.N., L.C., A.P., F.A.C.P., J.H.H.M., and J.E.R.B. wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Funding This project was partially supported by Grant PAPIIT, DGAPA UNAM (IT202120).

Data availability The data supporting this study's findings are available from the corresponding author upon reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Statement of animal rights The protocols used in this study were reviewed and approved by the Universidad Nacional Autónoma de México (DC-2018/2-1), Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals, according to official animal care normativity (NOM-062-ZOO-1999) (Diario Oficial de la Federación, 2001).

Consent to participate All authors have consented to participate.

Consent for publication All the authors consent to publish the manuscript.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Allen, M.S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 83 (7), 1598-1624.
- AOAC International. 2015. Official Methods of Analysis. 19th ed Association of Official Analytical Chemists. Urbana, USA.
- Audsley, E., and Wilkinson, M. 2014. What is the potential for reducing national greenhouse gas emissions from crop and livestock production systems? *Journal of Cleaner production*, 73, 263-268.
- Avellaneda Cevallos, J., Cabezas Guerrero, F., Quintana Zamora, G., Luna Murillo, R., Montañez Valdez, O.D., Espinoza Guerra, I. and Pinargote Mendoza, E. 2008. Agronomic behavior and chemical composition of three varieties of "Brachiaria" at different harvest ages. *Science and technology (Quevedo)*, 1 (2), 87-94.
- Bayat, A.R., Tapio, I., Vilkki, J., Shingfield, K.J. and Leskinen, H. 2018. Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield. *Journal of dairy science*, 101 (2), 1136-1151.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84 (6), 1489-1496.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Petit, H.V. 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 87 (3), 431-440.
- Beauchemin, K. A., Ungerfeld, E. M., Abdalla, A. L., Alvarez, C., Arndt, C., Becquet, P., ... and Kebreab, E. 2022. Invited review:

- Current enteric methane mitigation options. *Journal of Dairy Science*, 105(12), 9297–9326.
- Bonilla Cárdenas, J.A.; Lemus Flores, C. 2012. Emission of enteric methane by ruminants and its contribution to global warming and climate change: Review. *Mexican Journal of Livestock Sciences*, 3 (2), 215–246.
- Canas, A., Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Pell, A. N., Van Soest, P. J. 2004. A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. *Journal of Animal Science*, 82(1), 149–169.
- Cochran, W.G., Cox, G.M. 1992. Experimental designs. 2nd ed. Wiley Classics Library. (John Wiley & Sons). New York, USA.
- Cook, C. W. 1964. Symposium on nutrition of forages and pastures: collecting forage samples representative of ingested material of grazing animals for nutritional studies. *Journal of Animal Science*, 23(1), 265–270.
- Cosgrove, G.P., Waghorn, G.C., Anderson, C.B., Peters, J.S., Smith, A., Molano, G., Deighton, M. 2008. The effect of oils fed to sheep on methane production and digestion of ryegrass pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48 (2), 189–192.
- Desbois, A.P., Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 85 (6), 1629–1642.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M. 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology*, 32 (1), 47–51.
- Estrada-Angulo, A., Castro-Pérez, B. I., Urias-Estrada, J. D., Ríos-Rincón, F. G., Arteaga-Wences, Y. J., Barreras, A., López-Soto, M.A., Plascencia, A., Zinn, R. A. 2018. Influence of protein level on growth performance, dietary energetics and carcass characteristics of Pelibuey × Katahdin lambs finished with isocaloric diets. *Small Ruminant Research*, 160, 59–64.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5ta ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geografía. México.
- Garnsworthy, P.C., Craigon, J., Hernandez-Medrano, J.H., Saunders, N. 2012. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of dairy science*, 95 (6), 3166–3180.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analysis. A. R. S. Hand Book No. 379. Department of Agriculture, Washington, D. C., USA.
- Grainger, C., Beauchemin, K.A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal feed science and technology*, 166, 308–320.
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P. et al. 2016. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Clim Change* 6, 452–461.
- Hristov, A.N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J. & Oosting, S. 2013a. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production—A review of technical options for non-CO₂ emissions. Edited by Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson and Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 177. FAO, Rome, Italy.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E.; Waghorn, G., Gerber, P.J. 2013b. Special topics, Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of animal science*, 97 (11), 5045–5069.
- Hristov, A.N.; Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T.W., Harper, M.T., Weeks, H.L., Branco A.F., Moate P.J., Deighton M.H., Williams R.O., Kindermann, M., Duval, S. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (34), 10663–10668.
- Huhtanen, P., Ahvenjärvi, S., Broderick, G.A., Reynal, S.M., Shingfield, K.J. 2010. Quantifying ruminal digestion of organic matter and neutral detergent fiber using the omasal sampling technique in cattle—A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93 (7), 3203–3215.
- IPCC, 2006. Emissions from Livestock and Manure Management. In: H. S. Eggleston, B. L., K. Miwa, T. Ngara, and K. Tanabe (eds), 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, (Institute for Global Environmental Strategies (IGES): Hayama, Kanagawa, Japan), 10.1–10.87
- Jenkins, T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of dairy science*, 76 (12), 3851–3863.
- Jenkins, T.C., Palmquist, D.L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 67 (5), 978–986.
- Johnson, K. A., and Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2483–2492.
- Kaewpila, C., and Sommart, K. 2016. Development of methane conversion factor models for Zebu beef cattle fed low-quality crop residues and by-products in tropical regions. *Ecology and evolution*, 6(20), 7422–7432.
- Kennedy, P.M., Charmley, E. 2012. Methane yields from Brahman cattle fed tropical grasses and legumes. *Animal Production Science*, 52 (4), 225–239.
- King, K.R., Stockdale, C.R.; Trigg, T.E. 1990. Influence of high energy supplements containing fatty acids on the productivity of pasture-fed dairy cows. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30 (1), 11–16.
- Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A.; Weiss, W.P., Tricarico, J.M. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of dairy science*, 97 (6), 3231–3261.
- Kumar, S., Choudhury, P.K., Carro, M.D., Griffith, G.W., Dagar, S.S., Puniya, M., Sirohi, S.K. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (1), 31–44.
- Lassey, K. R. 2007. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *Agricultural and forest meteorology*, 142(2–4), 120–132.
- Leone, A., Spada A.; Batezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. 2016. "Moringa oleifera Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health" *International Journal of Molecular Sciences* 17, no. 12: 2141. <https://doi.org/10.3390/ijms17122141>
- Machmüller, A., Kreuzer, M.C.J.A.S. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 79 (1), 65–72.
- Machmüller, A., Dohme, F., Soliva, C.R., Wanner, M., Kreuzer, M. 2001. Diet composition affects the level of ruminal methane suppression by medium-chain fatty acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52 (7), 713–722.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4 (3), 351–365.
- Martin, C.; Ferlay, A., Mosoni, P., Rochette, Y., Chilliard, Y., Doreau, M. 2016. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *Journal of Dairy Science*, 99 (5), 3445–3456.
- Mata e Silva, B.M., Lopes, F.C.F., Pereira, L.G.R., Tomich, T.R., Morenz, M.J.F.; Martins, C.E., ... Chaves, A.V. 2017. Effect of sunflower oil supplementation on methane emissions of dairy

- cows grazing *Urochloa brizantha* cv. marandu1. *Animal Production Science*, 57 (7), 1431–1436.
- McGeough, E.J., O'Kiely, P., Hart, K.J., Moloney, A.P., Boland, T.M., Kenny, D.A. 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *Journal of Animal Science*, 88 (8), 2703–2716.
- McGinn, S.M., Turner, D., Tomkins, N., Charmley, E., Bishop-Hurley, G., Chen, D. 2011. Methane emissions from grazing cattle using point-source dispersion. *Journal of Environmental Quality*, 40 (1), 22–27.
- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Grainger, C., Hannah, M.C., Ponnampalam, E.N., Eckard, R.J. 2011. Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 254–264.
- Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Pryce, J.E., Hayes, B.J., Jacobs, J.L., Wales, W.J. 2016. Reducing the carbon footprint of Australian milk production by mitigation of enteric methane emissions. *Animal Production Science*, 56 (7), 1017–1034.
- Muñoz, C.; Sánchez, R.; Peralta, A.M.T.; Espíndola, S.; Yan, T.; Morales, R.; Ungerfeld, E.M. 2019. Effects of feeding unprocessed oilseeds on methane emission, nitrogen utilization efficiency and milk fatty acid profile of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 249, 18–30.
- NASEM, 2016. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 8th Revised Edition. The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Washington, DC.
- Nogueira, R.G.S., Perna Junior, F., Pereira, A.S.C., Cassiano, E.C.O., Carvalho, R.F., Rodrigues, P.H.M. 2020. Methane mitigation and ruminal fermentation changes in cows fed cottonseed and vitamin E. *Scientia Agricola*, 77 (6), 1–10.
- Oliveira D.E., Medeiros, S.R., Tedeschi, L.O., Aroeira, L.J.M., Silva, S.C. 2007. Estimating forage intake of lactating dual-purpose cows using chromium oxide and n-alkanes as external markers. *Scientia Agricola*, 64 (2), 103–110.
- Onetti, S.G., Shaver, R.D., McGuire, M.A. 2001. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 84:2751–2759.
- Patra, A.K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livestock Science* 155, 244–254.
- Patra, A.K., 2017. Prediction of enteric methane emission from cattle using linear and non-linear statistical models in tropical production systems. Mitigation and adaptation strategies for global change, 22(4), pp.629–650.
- Pavan, E., Duckett, S.K., Andrae, J.G. 2007. Corn oil supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue. I. Effects on in vivo digestibility, performance, and carcass traits. *Journal of animal science*, 85 (5), 1330–1339.
- Piñares-Patiño, C.S., Franco, F.E., Molano, G., Kjestrup, H., Sandoval, E., MacLean, S., Laubach, J. 2016. Feed intake and methane emissions from cattle grazing pasture sprayed with canola oil. *Livestock Science*, 184, 7–12.
- Reid, C.S.W., 1959. The treatment and prevention of bloat with anti-foaming agents. *Proc. Nutr. Soc.* 18, 127–130.
- Ribeiro, J.C.S., Messana, J.D., Granja-Salcedo, Y.T., Carenin, R.C., Fiorentini, G., San Vito E., Furlan, L.R., Reis, R.A., Berchielli, T.T. 2016. Parameters of fermentation and rumen microbiota of Nellore steers fed with different proportions of concentrate in fresh sugarcane containing diets. *Archives of Animal Nutrition*, 70(5), 402–415
- Rivera-Villegas, A., Estrada-Angulo, A., Castro-Pérez, B. I., Urias-Estrada, J. D., Rios-Rincón, F. G., Rodríguez-Cordero, D.; Barreras, A., Plasencia, A., González-Viscarra, V.M., Sosa-Gordillo, J.F., Zinn, R. A. 2019. Comparative evaluation of supplemental zilpaterol hydrochloride sources on growth performance, dietary energetics and carcass characteristics of finishing lambs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(2), 209.
- Schneider, B.H., Flatt, W.P. 1975. *The evaluation of feeds through digestibility experiments*. University of Georgia Press.
- Tee, T. P., Goh, Y. M., Zainudin, M. H. M., Candyrim, S. C. L., Sommart, K., Kongphitree, K., ... and Liang, J. B. 2022. Enteric methane emission models for diverse beef cattle feeding systems in South-east Asia: A meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 294, 115474.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Looor, J.J., Chilliard, Y., Doreau, M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*, 86 (12), 3999–4007.
- Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*. 74: 3583–3597.
- Vazquez O.P., Smith T.R. 2000. Factors affecting pasture intake and total dry matter intake in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83 (10), 2301–2309.
- Williams, C.H., David, D.J., Iismaa, O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *The Journal of Agricultural Science*, 59 (3), 381–385.
- Woodward, S.L., Waghorn, G.C and Thomson, N.A. 2006. Supplementing dairy cows with oils to improve performance and reduce methane—does it work? In: Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. (New Zealand Society of Animal Production). Vol. 66, p. 176–181. Napier, NZ.
- Wu, D.; Xu, L., Tang, S., Guan, L., He, Z., Guan, Y., ... Wang, M. 2016. Influence of oleic acid on rumen fermentation and fatty acid formation in vitro. *PLoS one*, 11 (6), e0156835.
- Yarza, Y.R., Szumacher-Strabel, M., Jayanegara A., et al. 2021. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 105:874–889.
- Zeitz, J.O., Kaeuzer, M., Soliva, C.R. 2013. *In vitro* methane formation and carbohydrate fermentation by rumen microbes as influenced by selected rumen ciliate species. *European journal of protozoology*, 49 (3), 389–399.
- Zinn, R.A., Jorquera, A.P. 2007. Feed value of supplemental fats used in feedlot cattle diets. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23 (2), 247–268.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.