



AgEcon SEARCH

RESEARCH IN AGRICULTURAL & APPLIED ECONOMICS

The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search

<http://ageconsearch.umn.edu>

aesearch@umn.edu

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*

No endorsement of AgEcon Search or its fundraising activities by the author(s) of the following work or their employer(s) is intended or implied.

EVENTOS QUÍMICOS-FISIOLÓGICOS DEL METANO EN LOS RUMIANTES

CHEMICAL-PHYSIOLOGICAL EVENTS OF METHANE IN RUMINANTS

Ramírez-Briebesca, J.E.^{1*}

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Programa de Ganadería. Carretera Federal México Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-SUA. Ciudad Universitaria. Ciudad de México. C. P. 04510.

*Autor de correspondencia: efrenrb@colpos.mx

RESUMEN

Los rumiantes participan con el 18 % del metano (CH₄) total producido en el mundo, considerado como el segundo gas de efecto invernadero que acelera el cambio climático global. Durante el proceso fermentativo en el rumen, los iones dihidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂) son utilizados por arqueas para formar CH₄. En el tema de la metanogénesis, las investigaciones pecuarias se enfocan en diferentes líneas: 1) Identificar las especies y géneros metanógenos predominantes; 2) Estudiar los modelos estereoquímicos fermentativos en el rumen para capturar H₂; 3) Esclarecer las rutas de liberación de CH₄ en el organismo animal; y 4) Evaluar productos naturales y químicos para disminuir la formación de CH₄ entérico. En esta revisión se recaba información sobresaliente sobre el tema, se discuten diferentes estrategias para mitigar el CH₄ y reducir su impacto en el ambiente.

Palabras clave: Cambio climático, metano, actividad ganadera, metanogénesis, arqueas.

ABSTRACT

Ruminants contribute 18 % of the total methane (CH₄) produced in the world, considered the second greenhouse gas accelerating global climate change. During the fermentation process in the rumen, dihydrogen ions (H₂) and carbon dioxide (CO₂) are used by archaea to form CH₄. In the field of methanogenesis, livestock research focuses on different lines: 1) Identifying predominant methanogenic species and genera; 2) Studying fermentative stereochemical models in the rumen to capture H₂; 3) Clarifying the routes of CH₄ liberation in the animal organism; and 4) Evaluating natural and chemical products to decrease the formation of enteric CH₄. In this review, outstanding information on the subject is collected and different strategies to take better advantage of this natural process are discussed, and to reduce its impact on the environment.

Keywords: Climate change, methane, livestock activity, methanogenesis, archaea.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 2, febrero. 2018, pp: 22-33.

Recibido: diciembre, 2017. **Aceptado:** febrero, 2018.

INTRODUCCIÓN

La importancia de conocer la formación y función fisiológica del metano (CH₄) en los rumiantes radica en la contribución que tiene este gas en el calentamiento global y su efecto invernadero en el planeta. Específicamente, los rumiantes contribuyen con el 18 % del CH₄ total producido en el mundo (Beauchemin *et al.*, 2007). Durante el proceso fermentativo, la producción de los ácidos grasos volátiles, son rápidamente absorbidos en el rumen y utilizados como fuente de energía, mientras otros productos como el dihidrógeno (H₂) y el dióxido de carbono (CO₂) son utilizados por los microorganismos del rumen, pertenecientes al dominio Archaea para producir CH₄, el cual es liberado al exterior por el eructo y la espiración. El CH₄ se integra al grupo de gases que causa el efecto invernadero; por dicho motivo, los esfuerzos se encaminan en reducir las emisiones en los sistemas de producción animal. Varias estrategias se han sugerido para disminuir las emisiones de CH₄, pero para poderlas realizar es necesario conocer de inicio las rutas químicas y fisiológicas que ocurren en el organismo animal. El propósito es antagonizar estas vías metanógenas y no afectar los procesos fermentativos-digestivos de los nutrientes que demerite la productividad.

Este manuscrito aborda los eventos químicos fisiológicos de la formación de CH₄ en el rumen, la importancia estereoquímica de las moléculas, las vías de eliminación de CH₄ y factores inhibitorios fisiológicos de CH₄ hasta ahora estudiados.

Vía de fermentación de los alimentos, formación de ácidos grasos volátiles y metano

Las condiciones en el rumen deben tener una armonía con los microorganismos y los procesos de fermentación, esta actividad es factible cuando se tienen las siguientes propiedades físico-químicas idóneas en el rumen (Araujo y Vergara, 2007; van Lier y Regueiro, 2008): a) Ecosistema abierto y continuo: Permite la entrada de los sustratos y la salida de los productos (se incluye la proteína microbiana). b) Tiempo de retención: Permite la fermentación de los alimentos y la actividad microbiana [tasas de pasaje (*Kp*)]. c) Medio acuoso idóneo: Permite la actividad de las enzimas extracelulares y un ambiente ruminal anaerobio que es regulado por la concentración molar de los componentes en el rumen (osmolaridad desde 260 hasta 400 mOsm). e) pH entre 5.8 y 7.0 ($\text{pH rumen} = 7.74 + \log (\text{HCO}_3^- / \text{pCO}_2)$). f) La acción amortiguadora: Es compleja, sin embargo, influyen el

número de moles por litro de H⁺ necesarios para causar un cambio en el pH, la presión parcial de CO₂ y la concentración de sales de ácidos grasos de cadenas cortas; todos estos regulados por la producción de saliva. g) Potencial redox: La baja concentración de oxígeno en el rumen [potencial negativo de oxidación (Eh) entre -250 y -450 mV] estimula el crecimiento de algunos microorganismos. h) Temperatura en el rumen de 38 a 42 °C.

Los principales grupos microbianos que habitan en el rumen son anaerobios facultativos y contribuyen directa o indirectamente a la degradación de la materia orgánica de la dieta. 1) Las bacterias tienen la mayor densidad de población [10^{10-11} mL⁻¹ de fluido ruminal (fr)]. 2) Las arqueas (10^{8-9} mL⁻¹ fr), utilizan el CO₂ e H₂, originados por la actividad fibrolítica de bacterias, protozoos y hongos. 3) Los protozoos ciliados (10^6 mL⁻¹ fr), contribuyen hasta con la mitad de la biomasa microbiana ruminal por su tamaño, su defaunación afecta la digestión de la fibra. 4) Los hongos (10^6 mL⁻¹ fr) aportan menos del 8 % a la biomasa total, tienen microtúbulos llamados hidrogenosomas y también sintetizan acetato, formato, lactato y etanol (Ho y Abdullan, 1999; Lourenço *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013). La formación de CH₄ es un proceso fisiológico normal que contribuye al correcto funcionamiento fermentativo del rumen, contrarrestando la inhibición de otros microorganismos provocado por la acumulación de H₂ (Kumar *et al.*, 2014).

Los carbohidratos ingeridos por los rumiantes se degradan en monómeros por acción microbiana. Posteriormente, la fermentación del piruvato da como resultado la síntesis de los tres principales ácidos grasos volátiles (AGV) acetato, butirato y propionato así como alcoholes. El proceso inicia con la vía más común, la degradación de la hexosa a través de la glucólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas), produciendo dos piruvatos, ATP (adenosín trifosfato), y el NAD⁺ es reducido a NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina-reducida). Por las condiciones anaerobias en el rumen, el NAD⁺ se reoxida, para mantener la glucólisis posible y continuar con el metabolismo microbiano dependiente del piruvato. La producción de butirato se acopla con la oxidación del NADH y se reduce a acetoacetyl-CoA y crotonyl-CoA. Diferentes microorganismos fermentativos también convierten el piruvato en etanol, lactato o succinato, lo que da como resultado una oxidación directa de NADH. El acetato es el AGV predominante en el rumen, pero la producción de piruvato no está directamente acoplada a la oxidación de NADH. En este caso, NADH se oxida

a través de la producción de H₂, que se inhibe con un nivel elevado en la presión parcial del hidrógeno (pH₂) (Song et al., 2014; Van Lingen et al., 2016). En el Cuadro 1 se describen las reacciones que forman y utilizan los H₂.

El acetato y butirato son nutrientes lipogénicos y son fuente de H₂ disponible, mientras que la formación de propionato es una vía competitiva para utilizar el H₂ en el rumen. Las arqueas metanógenas (ej. *Methanobacterium ruminantium*) también usan el H₂ disponible y lo combinan con el CO₂ formando CH₄ (aunque otras fuentes incluyen sulfato, nitrato y fumarato): 4H₂ + CO₂ → CH₄ + 2H₂O.

Durante este proceso fisiológico se mantiene un nivel bajo de la pH₂, lo que permite la oxidación de NADH en bacterias que no son capaces de acoplar directamente la oxidación de NADH a la reducción de metabolitos. Si el H₂ producido no es usado por los metanógenos, se inhibe la actividad de la hidrogenasa bacteriana y se limita la oxidación de los carbohidratos; hay producción de eta-

Cuadro 1. Reacciones de formación y utilización de dihidrógeno (H₂).

Reacciones que forman H ₂ :	Reacciones que utilizan el H ₂ :
Glucosa → 2 piruvatos + 4 H ₂ (vía Embden-Meyerhof)	Piruvato + 4H → Propionato (C3) + H ₂ O
Piruvato + H ₂ O → acetato (C2) + CO ₂ + 2H	2C2 + 4H → Butirato (C4) + 2H ₂ O
	CO ₂ + 8H → metano (CH ₄) + 2H ₂ O

nol o lactato, los cuales inhiben el crecimiento microbiano idóneo en la digestión de los forrajes. Explicando este proceso con más detalle: *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* son las bacterias más importantes en la degradación de la pared celular en el rumen, sintetizando iones H₂. Estas dos especies forman las enzimas requeridas para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa, su contenido de hidrolasa tiene la función de remover los equivalentes H⁺ excesivos, pero estas mismas bacterias pueden auto-inhibirse con su propio contenido de H₂ o la presencia de O₂ (Mosoni et al., 2011; Meier et al., 2016). La Figura 1 esquematiza las vías metabólicas comunes y posibles que pueden suceder en la fisiología del rumen.

La formación y competitividad de moléculas en el rumen pueden ser explicadas por su esteoquímica, basados en la distribución espacial de los átomos que componen las moléculas. En los procesos de fermentación del rumen se puede predecir la reactividad con la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG). La fórmula (ΔG=ΔH-TΔS) nos indica la entalpía (ΔH), definida como el contenido energético del sistema, es decir el calor (cedido o ganado) de una sustancia a presión constante, y la entropía (ΔS), la cual mide la parte no utilizable de la energía contenida en un sistema. T es la temperatura que multiplica a la entropía y solamente se expresa en grados Kelvin. Si el valor de ΔG es negativo, es una presión exotérmica porque libera energía, la reacción es espontánea,

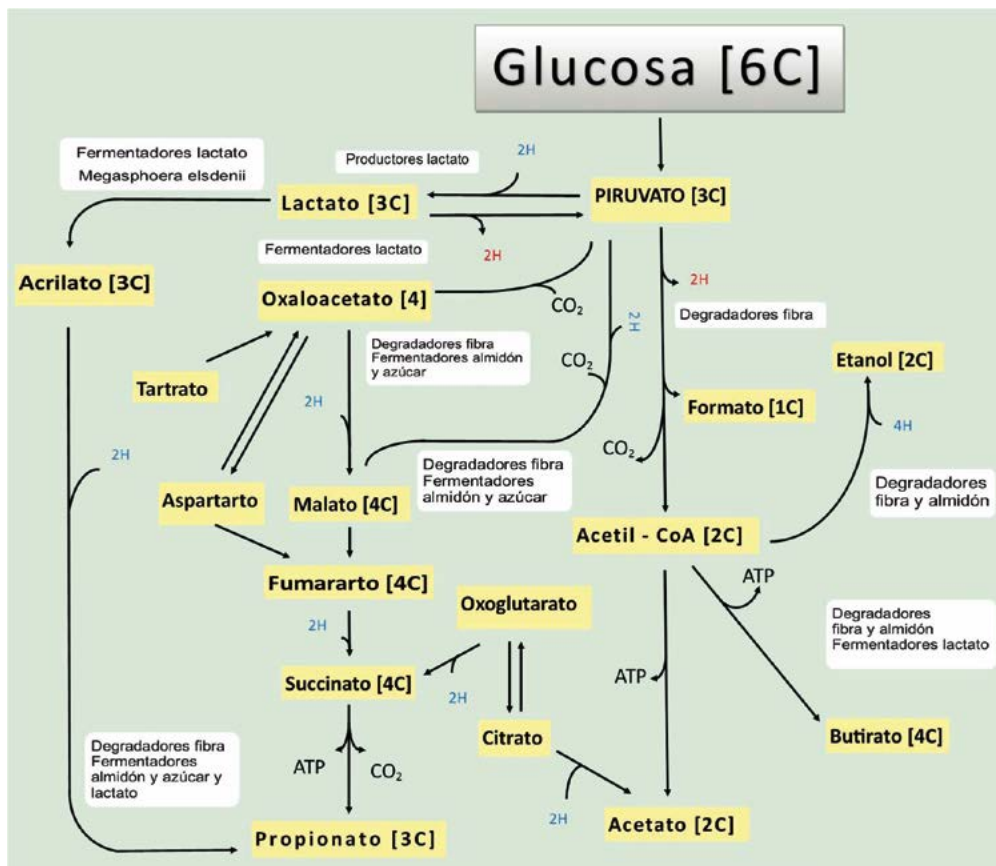


Figura 1. Vías metabólicas en la síntesis de ácidos grasos volátiles en el rumen (Adaptado de Najarra et al., 1997; McAllister y Newbold, 2008).

esto no quiere decir que se forme muy rápido, el significado es que se originan un producto. En este caso los electrones del H_2 y del CO_2 se configuran y forman CH_4 . Por otro lado, si absorbe calor, el valor de ΔG es positivo, la reacción es endotérmica, significando que la reacción no podría suceder. La molécula de CH_4 tiene un $\Delta G = -50.79$ kJ, a temperatura constante de $25^\circ C$ ($298^\circ K$), considerando los valores en la ecuación: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$: $-50.79 = (-74.85 - 298 \times 170.2)10^{-3}$, y ajustando a temperatura del rumen ($39^\circ C = 311^\circ K$), el valor es de $\Delta G = -49.74$ kJ (Figura 2; valores tomados de Offener y Sauvart, 2006), continua con valor negativo. De manera lógica, la temperatura es un valor que puede modificar el ΔG ; en el rumen es imposible su aumento ascendente, aunque en otros procesos anaeróbicos ambientales se

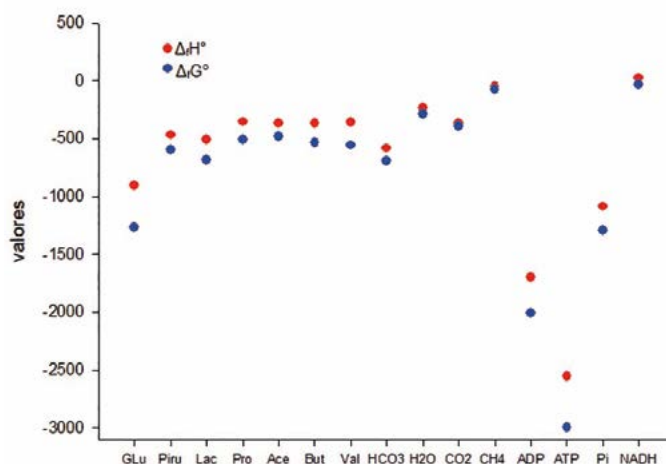


Figura 2. Valores de entalpía (ΔH°) y energía libre de Gibbs ($\Delta_r G^\circ$) en moléculas utilizadas y formadas en la fermentación del rumen (Offener y Sauvart, 2006).

captación de los H_2 .

Clasificación de arqueas metanógenas

Las arqueas (Tercer Reino Archaea, descubiertas en la Universidad de Illinois, EU (1977) por Wolfe R. y Woese C, acuñado el término arcaico por estos investigadores, debido a que son microorganismos que crecen en ausencia de oxígeno y producen CH_4), son un grupo de

puede realizar la manipulación térmica y controlar la formación de CH_4 . El Cuadro 2 muestra el ΔG° (condición estándar) en la fermentación de glucosa, interconversión de los AGV y la oxidación. Durante el proceso de metanogénesis $\Delta G^\circ = -172$ $kJ \cdot mol^{-1}$, es ligeramente menor en la conversión de glucosa a la formación de acético y propionico $\Delta G^\circ = -192$ $kJ \cdot mol^{-1}$, indicando competitividad entre la

Cuadro 2. Valores de la energía libre de Gibbs en procesos fermentativos en el rumen (Van Lingen *et al.*, 2016).

Conversión microbiana	Y_{ATP}	Y_{NADH}	ΔG° $kJ \cdot mol^{-1}$
Fermentación de glucosa			
$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2Ac^- + 2HCO_3^- + 4H_2 + 4H^+$	4	2	-52
$C_6H_{12}O_6 + 2.67 H_2O^a \rightarrow 0.67Ac^- + 0.67Bu^- + 2HCO_3^- + 3.33H^+ + 2.67H_2$	3.33	0.67	-111
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O^b \rightarrow Bu^- + 2HCO_3^- + 2H_2 + 3H^+$	3	0	-138
$C_6H_{12}O_6 + H_2O^c \rightarrow Ac^- + Pr^- + HCO_3^- + H_2 + 3H^+$	3.67	0	-159
$C_6H_{12}O_6^d \rightarrow 0.67 Ac^- + 1.33 Pr^- + 0.67HCO_3^- + 2.67H^+$	2.67	-0.67	-196
Interconversión de ácidos grasos volátiles			
$Ac^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2 \rightarrow Pr^- + 3H_2O$	0	-2	-113
$Pr^- + 3H_2O \rightarrow Ac^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	0.33	2	113
$Bu^- + 2H_2O \rightarrow 2 Ac^- + H^+ + 2H_2$	0.33	2	86
Cofactor de oxidación			
$NADH + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2$	0	ND	-25
$NADH + Fd^{2-}_{RED} + 3H^+ \rightarrow NAD^+ + Fd_{ox} + 2H_2$	0	ND	-102
Metanogénesis			
$HCO_3^- + H^+ + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	1.5-0.5 ^e	0	-172

^aProducción de butirato, vía ruta kinasa,

^bProducción de butirato vía ruta kinasa o combinación lineal de la reacción a) y $2Ac^- + 2C_8H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 3 Bu^- + 4HCO_3^- + 2H_2O + 5H^+$ para producir butirato vía transferasa CoA.

^cProducción de propionato vía succinato

^dProducción de propionato vía lactato

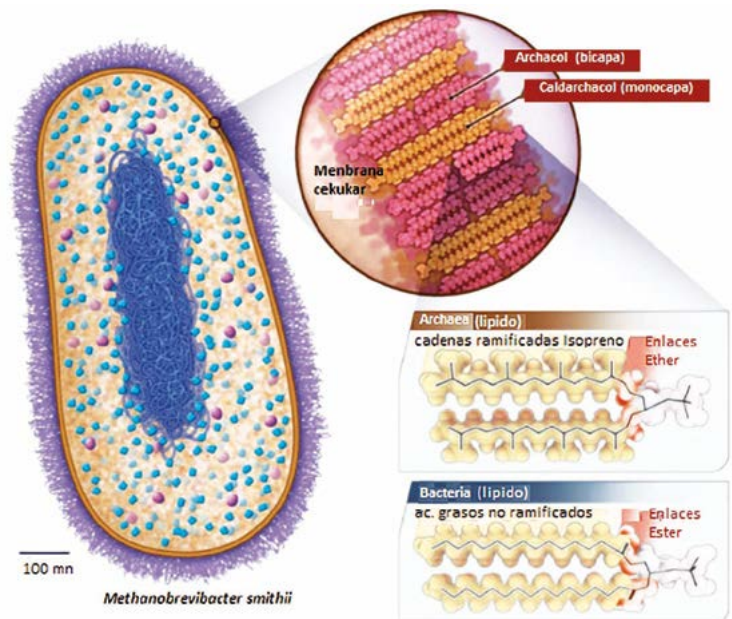
^ePara especies de Arqueas con y sin citocromos.

microorganismos unicelulares, similares a las bacterias (arqueobacterias: término mal empleado) en tamaño y forma, con morfología procariota (sin núcleo y orgánulos membranosos internos) (Figura 3).

Las arqueas metanógenas se clasifican en cinco órdenes: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* y *Methanopyrales*. La mayoría de las especies son inmóviles, solo los miembros del género *Methanothermus* se desplazan por un flagelo. El orden de las *Methanobacteriales* se divide en dos familias, *Methanobacteriaceae* y *Methanothermaceae*. La familia *Methanobacteriaceae* se integra por géneros mesofílicos: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* y *Methanosphaera*. En los rumiantes, las arqueas metanógenas oscilan de 108 a 1000 células por gramo de contenido ruminal, predominando los metanógenos hidrogenotrofos. La metanogénesis limita la acetogénesis hidrogenotrofa, disminuyendo la concentración de H₂ por debajo del nivel mínimo requerido para la acetogénesis (Hook et al., 2010; Shin et al., 2004; Wright et al., 2006).

Patra et al. (2017) indican que las arqueas en el rumen representan menos del 3.3 % del rRNA total (incluyendo 16S y 18S). Los metanógenos ruminales aislados han sido los siguientes: *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobrevibacter boviskoreani* (aislado del rumen del ganado coreano nativo), *Methanobacterium beijingense* (aislada del rumen de la cabra), *Methanoculleus marisnigri* (aislado del rumen del ganado indio mestizo), *Methanoculleus bourgensis* (aislado del rumen del ganado Holstein) y *Methanosarcina mazei* (aislado del rumen de ganado coreano Hanwoo). Las secuencias del gen 16S rRNA de los metanógenos cultivados representan el 0.7 % de las secuencias en arqueas totales de origen ruminal. La mayoría de los aislamientos son miembros de la familia *Methanobacteriaceae*. Pero las especies de *Methanobrevibacter*, incluyendo *M. ruminantium*, *M. thaueri*, y *M. smithii*, son los más predominantes (identificadas con el gen 16S rRNA). Sin embargo, también hay diversidad de otros metanógenos ruminales como *Methanosphaeras*, *Methanosarcinales* y *Methanococcales* (Jarvis et al., 2000).

Figura 3. *Methanobrevibacter smithii*. La pared celular (violeta) está compuesta de pseudomureína (y no de mureína como en las bacterias) hace que las arqueas sean resistentes a lisozima y antibióticos. La membrana celular (ocre) se compone de un lípido bicapa o monocapa con componentes de isopreno unidas a glicerol por enlaces de éter. La bicapa lipídica de bacterias es una columna de ácidos grasos unida a glicerol por enlace éster (Gottlieb et al., 2015).



Dependiendo del sustrato utilizado, los metanógenos se clasifican en tres grupos, según Liu y Whitman (2008):

1. Metanógenos hidrogenotrofos: Son los más comunes en el rumen, utilizan los iones H₂ y algunos de ellos usan formato para reducir el CO₂ (Thauer et al., 2008). $CO_2 + 8H \rightarrow CH_4 + 2H_2O$. Los acetógenos son hidrogenotrofos, reducen el CO₂ para formar acetato ($4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$) mediante la vía Wood-Ljungdahl (acetogénesis reductiva). Las bacterias acetogénicas son las principales que utilizan H₂ para reducir el CO₂ a acetato. La acetogénesis, en lugar de la metanogénesis del H₂, es favorable, ya que da como resultado el acetato, que es absorbido por el animal y utilizado como energía (Fonty et al., 2007) (Cuadro 3).
2. Metanógenos metilótrofos: Utilizan compuestos metílicos a partir de metanol, metilaminas

Cuadro 3. Reacciones químicas del acetato y valores de la energía libre de Gibbs en algunos metanógenos.		
Acetato	ΔG (kJ mol ⁻¹ CH ₄)	Tipo de metanógenos
$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-135	La mayoría de los metanógenos
$4 HCOOH \rightarrow CH_4 + 3 CO_2 + 2 H_2O$	-130	Varias metanógenas Hydrogenotrofas
$CO_2 + 4isopropanol \rightarrow CH_4 + 4 acetona + 2 H_2O$	-37	Algunas metanógenas hydrogenotrofas
$CO_2 + 4isopropanol \rightarrow CH_4 + 4 acetona + 2 H_2$	-196	<i>Methanothermobacter</i> y <i>methanosarcina</i>

o sulfuros de metilo y los oxidan parcialmente al CO₂ para producir electrones que pueden usarse para reducir aún más los grupos metilo a CH₄ (Liu y Whitman 2008; Poulsen et al., 2013) (Cuadro 4).

3. Metanógenos acetotrofos: Utilizan el grupo metilo del acetato para la disimilación y producción de CH₄ y CO₂. Los metanógenos acetotrofos son archaeas anaerobios facultativos que convierten el acetato en CH₄ y CO₂. La actividad y el rendimiento de los metanógenos acetotrofos son de importancia en la conversión anaeróbica de acetato (Cuadro 5).

La combinación de H₂ + CO₂ es la vía más común de los metanógenos en la metanogénesis. El CO₂ se reduce sucesivamente a CH₄ por acción del H₂ como donador primario de electrones a través de formilo, metilo, metileno y metilo-intermedio. La reducción del resto de carbono implica varios pasos catalizados por un número de cofactores y enzimas (Figura 4; con base en Qiao et al., 2014).

Importancia del ion hidrógeno (H⁺) y dihidrógeno (H₂) en la síntesis de metano

La cinética de distribución y transferencia del hidrógeno en las moléculas del rumen no ha sido completamente

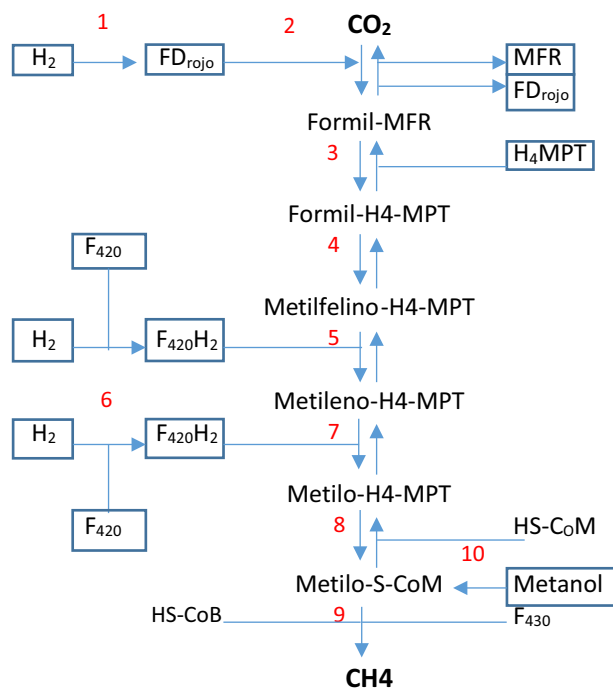


Figura 4. Vía de metanogénesis de H₂ + CO₂ y metanol. F₄₂₀H₂: Reducido de coenzima F₄₂₀; HDrojo: Reducido de ferredoxina; MFR: Metanofurano; H₄MPT: Tetrahidromethanopterin; HS-CoM; Coenzima M; HS-CoB: Coenzima B. Enzimas: 1. Ech hidrogenasa; 2. formilmetanofurano deshidrogenasa; 3. formil-MFR:H₄MPT-formiltransferasa; 4. metil-H₄MPT-ciclohidrolasa; 5. metileno-H₄MPT-deshidrogenasa; 6. F₄₂₀ hidrogenasa-reducida; 7. metileno-H₄MPT reductasa; 8. metil-H₄MPT:HS-CoM-metiltransferasa; 9. metil-CoM reductasa; 10. metanol: coenzima metiltransferasa.

Cuadro 4. Reacciones químicas de compuestos metilados y valores de la energía libre de Gibbs en algunos metanógenos.		
Compuestos metilados Cl	ΔG (kJ mol ⁻¹ CH ₄)	Tipo de metanógeno
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-105	<i>Methanosarcina</i> y otros metilótrofos
$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-113	<i>Methanomicrococcus blatticola</i> , <i>Methanosphaera</i>
$2(CH_3)_2S + 2 H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2S$	-49	<i>Methanosarcina</i> y otros metilótrofos
$4(CH_3)_2NH_2 + 2 H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_3$	-75	Algunos metilótrofos
$2(CH_3)_2NH + 2 H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$	-73	
$4(CH_3)_3N + 6 H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$		
$4CH_3NH_3Cl + 2 H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4Cl$		

Cuadro 5. Reacción química y energía libre de Gibbs en metanógenos acetotrofos.		
Acetato	ΔG (kJ mol ⁻¹ CH ₄)	Tipo de metanógeno
$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	-33	<i>Methanosarcina</i> y <i>Methanosaeta</i>

elucidada y presenta puntos oscuros en sus vías metabólicas. En este apartado trataremos de explicar su importancia fisiológica en la formación del CH_4 . De inicio se sabe que la actividad del hidrógeno es esencial durante la fermentación ruminal y la presión parcial del mismo hidrógeno (fracción molar del hidrógeno diatómico, P_{H_2}) es determinante en la metanogénesis del rumen. Sin embargo, el balance de ion H^+ y la concentración del gas H_2 disuelto, determinan el potencial redox en el rumen. Más del 90 % de los átomos de hidrógeno en el rumen se encuentran en el agua (H^+ %: Agua 91, alimento 6, microbios 2, $\text{CH}_4 < 0.1$, $\text{H}_2 < 0.1$) (Hegarty y Gerges, 1999).

La transferencia de protones se da durante la fermentación microbiana, de modo que una proporción sustancial de los átomos H^+ (derivados del agua) son reducidos a H_2 para formar CH_4 , ésta última forma pasa a ser un gas no polar y poco soluble en el agua, la P_{H_2} (considerando la velocidad con la cual se disuelve el H_2) es determinante en el proceso de la metanogénesis.

Teóricamente, el volumen de CH_4 formado en el rumen de un bovino es de 200 a 400 L por día (Okine *et al.*, 1989) el valor corresponde a la utilización de 800 a 1600 L de H_2 , la relación es de 4 moles de H_2 por mol de CH_4 producido, a un gasto de calor de combustión de $0.211 \text{ Mcal mol}^{-1}$. Paralelamente, por cada 65 L de CH_4 se requiere el uso de 152 L de CO_2 (Baldwin y Allison 1983; Baldwin, 2000). La importancia de cuantificar el H_2 inició con los estudios de Hungate en los años 60s, quien propuso que los organismos que utilizan el H_2 cambian el flujo de electrones y modifican los productos finales de la fermentación. En condiciones normales las dietas con forraje contienen una concentración desde 0.4 hasta 3.4 M H_2 disuelto, mientras las dietas con grano, la concentración de H_2 es en promedio de 3.3 M H_2 disuelto (rango = 0.2-28 M) (Hungate 1970; Barry *et al.*, 1977). También se ha medido el H_2 como gas en el aliento de ovejas alimentadas con ensilaje, reportando cantidades de 2 a 15 ppm (Takenaka *et al.*, 2008), pero capturar el gas exhalado se contamina con el H_2 ambiental ($\sim 0.5 \text{ ppm}$). Un estudio realizado por Smolenski

y Robinson (1988) utilizaron un detector ultrasensible con vapor de mercurio para detectar H_2 en sedimentos terrestres; este fue adaptado con un tubo de teflón directamente a los compartimentos del rumen, a través de las cánulas ruminales, realizándose la cuantificación de H_2 cada 3h durante 8 meses. Algunos de los resultados se muestran en la Figura 5; la concentración de H_2 (línea marrón) incrementó inmediatamente, por unos minutos con la ingestión de cada comida (línea verde), luego se mantuvo en cantidades bajas después de las ingestiones.

Los metanógenos usan inmediatamente el H_2 , éste no se acumula en el rumen. De hecho, trazas de H_2 en el rumen pueden inhibir la actividad de hidrogenasa (ya se explicó anteriormente) y limitan la oxidación de los azúcares, cuando no hay rutas alternativas para la eliminación de H_2 . La inhibición metanógena también se puede dar por el bloqueo del monóxido de carbono, alterando la digestibilidad de la celulosa y hemicelulosa hasta un 40 % (Russell y Wilson, 1996). La baja P_{H_2} (10^{-4} atm ; 0,01 kPa) favorece las vías metabólicas de las bacterias celulolíticas y la metanogénesis ruminal, a través de la transferencia de H_2 . Hay mayor contenido de NADH^+ por glucólisis y oxidación del

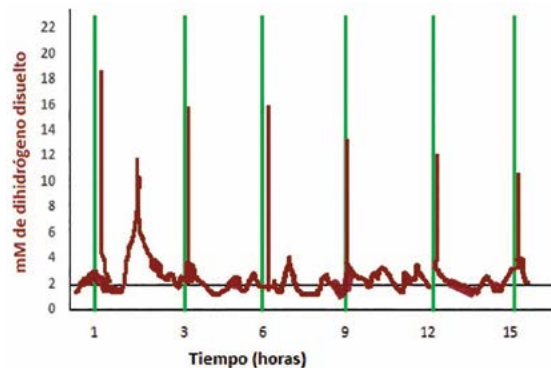


Figura 5. Concentración de dihidrógeno disuelto en el retículo de bovinos alimentados con ocho comidas al día (Smolenski y Robinson, 1988).

gliceraldehído-3-fosfato. Se modula la formación de los AGV, principalmente la formación de propionato se describe como una vía de utilización de H_2 (pero no estrictamente ocurre), aunque la formación de propionato está fuertemente asociada con la disminución de CH_4 (Janssen, 2010).

Los metanógenos ruminales utilizan el H_2 y reducen el CO_2 a CH_4 en secuencias acopladas a la síntesis de ATP, donde el CO_2 es la fuente de carbono y el H_2 es el principal donador de electrones (Ramírez *et al.*, 2014). El aumento de la P_{H_2} reduce la desaminación de aminoácidos. Cultivos *in vitro* de *Ruminococcus albus* forman acetato, etanol, H_2 y CO_2 , pero cuando se co-cultivaron con un metanógeno, el etanol bajó, mientras que la producción de H_2 , acetato y ATP aumentaron; este tipo de relación con simbiosis genera la transferencia de H_2 entre especies (Fonty 1996; Kumar *et al.*, 2014).

Por otro lado, las tasas de pasaje de la ingesta (sólidos y líquidos) son esenciales para mantener la concentración y la P_{H_2} . Varios estudios concluyen que el aumento en la velocidad de paso ocasiona disminución en la producción de CH_4 y mayor formación de propionato por unidad de alimento digerido (Okine *et al.*, 1989; Pinares-Patiño *et al.*, 2003). La cantidad de protozoarios en el rumen disminuye, cuando las tasas de pasaje son altas, mientras los microbios celulolíticos producen acetato e H_2 (Franzolin y Dehority, 1996). Por el contrario, los microbios amilolíticos producen menos H_2 y más propionato. La actividad ideal de los metanógenos se da con el rango de pH de 6.0 a 7.0, y con límites en pH de 5.5 a 6.5 (Rea *et al.*, 2007). Dado que la disminución del pH se asocia con una mayor tasa de pasaje, posiblemente los metanógenos requieran una concentración de H_2 mayor para su sobrevivencia. La tasa de crecimiento en los metanógenos se da con su crecimiento máximo posible (μ_{max}) en condiciones fisicoquímicas predominantes a una concentración teórica infinita de la fuente de energía y su concentración (H_2), describiéndose con siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_{max} \times s / (K_s + s)$$

donde: K_s es la constante de Monod, que describe la concentración de la fuente de energía a la cual es $\mu = 0.5 \times \mu_{max}$ para que los metanógenos tengan las condiciones fisicoquímicas predominantes.

Lo que indica que en la relación Monod, se requiere una concentración de H_2 que permita la tasa de crecimiento. Las concentraciones de H_2 en el rumen se controlan por la cinética de crecimiento del metanógeno, las vías de fermentación y la estereoquímica de los productos formados (Figura 6).

Rutas metabólicas para inhibir la formación de metano

Una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos han sido probados, la mayoría muestra una eficaz respuesta *in vitro* o en modelos mesocosmos, pero *in vivo* hay inconsistencias en su eficacia. Las variaciones en el

microbioma del rumen, la cinética de fermentación, respuesta anti-metanógena y la dieta son factores que influyen en la respuesta (Patra *et al.*, 2017). Por la extensión limitada en este capítulo, es difícil describir químicamente la acción de las vías inhibitorias de metano. Estas se resumen en la Figura 7.

Los ionóforos inhiben bacterias gram negativas como clostridios y *Ruminococcus* que forman acetato e H_2 . También inhiben bacterias gram negativas que forman formato e H_2 (Chalupa, 1988). Particularmente, la monensina disminuye la formación de CH_4 en más de 10 % (McGinn *et al.*, 2004). Las bacteriocinas como Bovicin HC5, Nisin y bacteriocina producida por *Streptococcus* spp. suprimen el CH_4 en 50 % *in vitro* (Lee *et al.*, 2002; Houlihan y Russell, 2006). La defaunación ruminal de los protozoa es otra alternativa que se ha usado para disminuir la metanogénesis, con base a la revisión realizada no se sugiere su uso, debido a las limitaciones en la fermentación ruminal que se ocasionan; el uso y tipo de aceite en la dieta para inducir la biohidrogenación puede generar interacciones eficientes entre metanógenos, bacterias y protozoa en las emisiones de CH_4 (Wang *et al.*, 2017). Los compuestos con un potencial *redox* más alto que el CO_2 como malato, acrilato, oxaloacetato y fumarato pueden redirigir termodinámicamente los equivalentes en la fermentación ruminal y formar menos CH_4 y más propionato o ser usados en el anabolismo para la síntesis de aminoácidos u otras moléculas (Foley *et al.*, 2009).

Se han aplicado una variedad de productos químicos para inhibir la metanogénesis en el ganado y reducir las emisiones de CH_4 , redirigiendo la energía hacia la eficiencia de la alimentación y la producción (Beauchemin *et al.*, 2009). Los inhibidores metanógenos más comúnmente utilizados son el 2-bromoetanosulfonato (BES), éste es un análogo de la coenzima M, su función es inhibir el crecimiento en alquenos alifáticos (Patra *et al.*, 2017). El ácido propinóico (AP), un análogo de propionato insaturado con un enlace triple de carbono que también es un inhibidor eficaz de la metanogénesis (Ungerfeld *et*

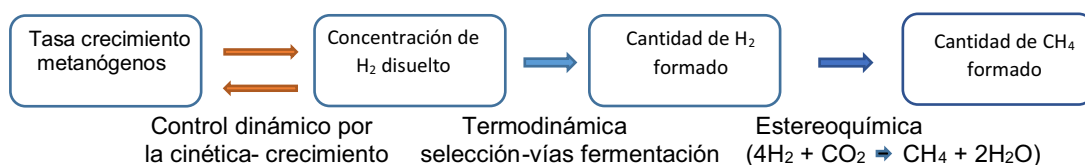


Figura 6. Modelo con combinaciones cinéticas, termodinámica y estereoquímica de dihidrógeno y metano (Janssen, 2010).

los mecanismos fisiológicos de la eliminación de CH₄ en los rumiantes.

Murray *et al.* (1976) mencionan valores de 85 a 90 % del CH₄ proviene de la fermentación entérica. El 95 % de CH₄ en el rumen se excreta por eructos, el 89 % del CH₄ producido se exhala y el 1 % se elimina por el ano. El balance calculado con ovejas canuladas se presenta en la Figura 8.

La mucosa del colon tiene uniones estrechas entre las células epiteliales, esta estructura permite la absorción de iones sodio y cloro, creando un gradiente osmótico que favorece la absorción del agua; el CH₄ y otros gases se benefician con esta actividad y atraviesan la mucosa del colon, para ingresar al torrente sanguíneo por sistema porta. El movimiento se da por difusión, con un gradiente de presión parcial máxima de 50 mm Hg para el CO₂ y CH₄, pero debido a la baja solubilidad del CH₄, la absorción es lenta. La producción de CO₂, H₂ y CH₄ en el colon hace que la pN₂ sea menor en la luz intestinal que en la sangre, y la baja pO₂ en el colon favoreciendo las proliferaciones de microorganismos anaerobios, los cuales conforman el 99 % de la flora en colon. Estudios realizados en humanos indican que una parte de H₂ y CH₄ siguen la ruta de absorción y excreción mencionada (~15-25 %), la otra proporción de estos gases se eliminan principalmente por las flatulencias. La presencia de CH₄ en sangre humana es indicativo de problema en el tránsito intestinal, síndrome de intestino irritable de tipo obstipación (de-Lacy *et al.*, 2013), la concentración de 0.33 M CH₄ en sangre por una intoxicación externa causa 50 % de hemólisis (Batliwala *et al.*, 1995). En clínica humana, la excreción pulmonar de CH₄ se utiliza como un indi-

cador de la producción CH₄ en el colon. En los rumiantes, el CH₄ post-gástrico es eliminado por vía respiratoria como ya se mencionó. Sin embargo, Dougherty *et al.* (1967) supusieron que una cantidad de CH₄ formado en el rumen alcanza la circulación sanguínea y se elimina por los pulmones. Si bien se conocen los mecanismos fisiológicos de transformación y absorción en rumen del CO₂ y NH₄, se pensaría un mecanismo similar para el CH₄, pero no hay reportes de algunas pruebas fisiológicas que lo describa y lo replique. El CH₄ es un gas ligero, junto con el CO₂ se concentra en las regiones superiores del rumen, no se sabe cuánto del gas se puede mezclar en la digesta, aunque su solubilidad es de aproximadamente 1,5 mM CH₄ a presión atmosférica (Batliwala *et al.*, 1995). Como es sabido, la proporción porcentual de los gases formados en el rumen, son aproximadamente: CO₂, 55; CH₄, 29; H₂, 0.16; O₂, 2; y N₂, 12. El sistema bicarbonato del rumen es un sistema de amortiguamiento donde los protones reaccionan con HCO₃⁻ para formar H₂O y CO₂ ($H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H_2O + CO_2$). La concentración de HCO₃⁻ está modulada por el pH y la pCO₂ (36.7 a 66.5 kPa), manteniéndose un equilibrio constante con la eliminación por eructo y la absorción de CO₂ en el rumen. En el caso de amoníaco, debido al alto valor de pKa (9.2), el NH₃ se une inmediatamente a un H⁺ en cantidades equimolares y forma NH₄⁺ en el contenido ruminal; posteriormente, en el paso de NH₄⁺ a la sangre, se elimina un protón, facilitando la expresión de los canales de K⁺ y la eficiencia adecuada de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa ruminal para facilitar el transporte. El paso de los AGV disminuye el gradiente eléctrico, des-polarizan la membrana basolateral y facilita el paso de NH₄⁺ (Aschenbach *et al.*, 2011). Aparentemente el transporte de CH₄ por la pared del rumen puede darse por

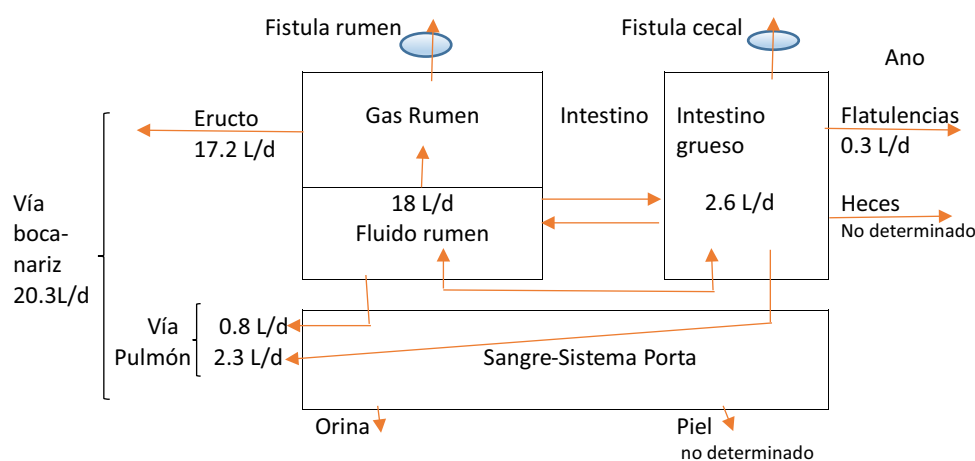


Figura 8. Modelo de producción y movimiento de metano litros por día (L d⁻¹) en ovejas alimentadas con paja de alfalfa (Murray *et al.*, 1976).

diferencias de presión entre los gases del rumen en la región superior y la sangre. Un planteamiento experimental para evaluar el paso de CH₄ hacia la circulación sanguínea se puede plantear con un estudio en tejidos espláncnicos, donde se usen catéteres en la vena derecha ruminal, mesentérica, hepática, porta y arterias hepática y carótida, utilizando ácido paraaminohipúrico como marcador para medir los balances de CH₄ en los flujos (flow y flux) sanguíneos.

CONCLUSIÓN

El concepto de disminuir las emisiones de CH₄ en la ganadería, cada vez es más relevante. Para poderlo mitigar, es necesario conocer las rutas fisiológicas en su formación, su distribución en el organismo y su liberación al ambiente por el animal. Hasta ahora la identificación de las arqueas metanógenas, la captura y competitividad fisiológica de los dihidrógenos, son el gran reto en la investigación. Con las publicaciones actuales, es posible concluir, que no se puede eliminar totalmente la formación de metano en el rumiante; fisiológicamente es un mal necesario, donde se debe conocer el punto de equilibrio entre la cantidad de metano entérico formado, la salud del animal y la productividad.

LITERATURA CITADA

- Anderson R.C., Krueger N.A., Stanton T.B., Callaway T.R., Edrington T.S., Harvey R.B. 2008. Effects of select nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *Bioresource Technology* 99: 8655-8661.
- Araujo F.O., Vergara L., López J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 15(Supl. 1): 133-140.
- Aschenbach J.R., Penner G.B., Stumpff F., Gäbel G. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science* 89: 1092-1107.
- Baldwin R.L. 2000. Introduction: History and Future of Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals. *In: McNamara J.P., France J., Beever E.E. (eds.). Modelling nutrient utilization in farm animals*. CABI Publishing. pp. 1-9.
- Baldwin R.L., Allison M.J. 1983. Rumen metabolism. *Journal of Animal Science* 57: 461-477.
- Barry T.N., Thompson A., Armstrong D.G. 1977. Rumen fermentation studies on two contrasting diets. 1. Some characteristics of the *in vivo* fermentation with special reference to the composition of the gas phase, oxidation/reduction state and volatile fatty acid proportions. *Journal of Agricultural Science* 89: 183-195.
- Battliwala H., Somasundaram T., Uzgiris E.E., Makowski L. 1995. Methane-induced hemolysis of human erythrocytes. *Biochemical Journal* 307: 433-438.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M., Petit H.B. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science* 87: 431-440.
- Beauchemin K.A., McAllister T.A., McGinn S.M. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4: 1-18.
- Broucek J. 2014. Production of methane emissions from ruminant husbandry: A review. *Journal of Environmental Protection* 5: 1482-1493.
- Chalupa W. 1988. Manipulation of rumen fermentation. *In: Haresign W., Cole D.J.A. (eds.). Recent developments in ruminant nutrition – 2: Butterworth-Heinemann: London. pp. 1-18.*
- de-Lacy C., Ledochowski M., Ratcliffe N.M. 2013. The importance of methane breath testing: a review. *Journal of Breath Research* 7: 024001.
- Dougherty R.W., O'toole J., Milton N.D., Allison J. 1967. Oxidation of intra-arterially administered carbon14-labelled methane in sheep. *PSEBM* 124: 1155-1157.
- Foley P.A., Kenny D.A., Callan J.J., Boland T.M., O'Mara F.P. 2009. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. *Journal of Animal Science* 87: 1048-1057.
- Fonty B.M. 1996. Ruminal methanogenesis and its alternatives. *Annales de Zootechnie, INRA/EDP Sciences* 45(Suppl1): 313-138.
- Fonty G., Joblin K.N., Chavarot M., Roux R., Michallon F. 2007. Methanogen-free lambs: establishment and development of ruminal hydrogenotrophs. *Applied and Environment of Microbiology* 73: 6391-6403.
- Franzolin R., Dehority B.A. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of Animal Science* 74: 2803-2809.
- Gottlieb K., Wachter V., Sliman J., Pimentel M. 2015. Review article: inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 43: 197-212.
- Hegarty C., Gerdes R. 1999. Hydrogen production and transfer in the rumen. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 12: 37-44.
- Ho Y.W., Abdullah N. 1999. The role of rumen fungi in fibre digestion. *Review. Asian-Australian Journal of Animal Science* 12: 104-112.
- Hook S.E., André-Denis G., Brian W., McBride W. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 2010: 945785.
- Houlihan A.J., Russell J.B. 2006. Factors affecting the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5: release, stability and binding to target bacteria. *Journal Applied of Microbiology* 100: 168-174.
- Hungate R.E. 1970. Interrelationships in the rumen microbiota. *In: Phillipson A.T. (ed.). Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Oriel Press Ltd, England. pp. 292-305.
- 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: 1-22.
- Jarvis G.N., Strömpl C., Burgess D.M., Skillman L.C., Moore E.R.B., Joblin K.N. 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current Microbiology* 40: 327-332.
- Kumar S., Choudhury P.K., Carro M.D., Griffith G.W., Dagar S.S., Puniya M., Calabro S., Ravella S.R., Dhewa T., Upadhyay R.C., Sirohi S.K., Kundu S.S., Wanapat M., Puniya A.K. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 98: 31-44.
- Kumar S., Dagar S.S., Puniya A.K., Upadhyay R.C. 2013. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions. *Research Veterinary Science* 94: 263-268.
- Lee S.S., Hsu J.-T., Mantovani H.C., Russell J.B. 2002. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 217: 51-55.
- Liu Y., Whitman W. 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Ann. N.Y. Academic Science* 1125: 171-189.

- Lourenço M., Ramos-Morales E., Wallace R.J. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4: 1008-1023.
- McAllister T.A., Newbold C.J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 7-13.
- McGinn M., Beauchemin K.A., Coates T., Colombatto D. 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science* 82: 3346-3356.
- Meier R.R., Kwon I.H., Cann I.K., Mackie R.I. 2016. Interspecies Hydrogen Transfer and Its Effects on Global Transcript Abundance in *Ruminococcus albus*, a Predominant Fiber-Degrading Species in the Rumen. *FASEB Journal* 17: 2.
- Mosoni P., Martin C., Forano E., Morgavi D.P. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science* 89: 783-791.
- Murray R.M., Bryant A.M., Leng R.A. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition* 36: 1-14.
- Nagaraja T.G., Newbold C.J., Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. London: Blackie Academic and Professional. pp. 523-632.
- Offener A., Sauvant D. 2006. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. *Animal Research* 55: 343-365.
- Okine E.K., Mathison G.W., Hardin R.T. 1989. Effects of changes in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle. *Journal of Animal Science* 67: 3388-3396.
- Patra A.K., Yu Z. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4271-4280.
- Patra A.K. 2016. Recent Advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emission in ruminants. *Review. Frontiers in Veterinary Science* 3: 1-17.
- Patra A.K., Park T., Minseok K., Kim K., Yu Z. 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8: 13.
- Pinares-Patiño C.S., Ulyatt M.J., Lassey K.R., Barry T.N., Holmes C.W. 2003. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *Journal of Agriculture Science* 140: 205-214.
- Poulsen C., Schwab B., Jensen B. 2013. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nature Communications* 4: 1428.
- Qiao J., Zhiliang T., Wang M. 2014. Potential and existing mechanisms of enteric methane production in ruminants. *Scientia Agricola* 71: 345-355.
- Ramírez J.F., Posada O., Noguera S. 2014. Ruminal methanogenesis and mitigation strategies. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 9: 307-323.
- Ramirez-Briebesca J.E. 2014. Biomethane production and clean up. In: Dikeman M., Divine C. (eds.). *Encyclopedia of Meat Science*. 2a. Ed. Elsevier. pp. 71-79.
- Rea S., Bowman J.P., Popovski S., Pimm C., Wright A.D.G. 2007. *Methanobrevibacter millerae* sp. nov. and *Methanobrevibacter olleyae* sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *International Journal System and Evolution of Microbiology* 57: 450-456.
- Romero-Perez A., Okine E., McGinn S., Guan L., Oba M., Duval S. 2015. Sustained reduction in methane production from long-term addition of 3-nitrooxypropanol to a beef cattle diet. *Journal of Animal Science* 93: 1780-1791.
- Russell J.B., Wilson D.B. 1996. Why are rumen cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* 79: 1503-1509.
- Shin E.C., Choi B.R., Lim W.J. 2004. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe* 10: 313-319.
- Smolenski W.J., Robinson J.A. 1988. *In situ* rumen hydrogen concentrations in steers fed eight times daily, measured using a mercury reduction detector. *FEMS Microbiology and Ecology* 53: 95-100.
- Song N., Zhang M.T., Binstead R.A., Fang Z., Meyer T.J. 2014. Multiple Pathways in the Oxidation of a NADH Analogue. *Inorganic Chemistry* 53: 4100-4105.
- Takenaka A., Mistumori M., Pinares-Patiño C.S., Ronimus R., Joblin K.N. 2008. Methane and hydrogen concentrations in the breath of sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: lxxxvii-lxxxviii.
- Thauer R.F., Kaster N.K., Seedorf S., Buckel W., Hedderich R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Focus on Sustainability* 6: 579-591.
- Ungerfeld E., Rust S.R., Boone D.R., Liu Y. 2004. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *Journal of Applied Microbiology* 97: 520-526.
- van Lier E., Regueiro M. 2008. Digestión en retículo-rumen. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- van Lingen H.J., Plugge C.M., Fadel J.G., Kebreab E., Bannink A., Dijkstra J. 2016. Thermodynamic Driving Force of Hydrogen on Rumen Microbial Metabolism: A Theoretical Investigation. *PLoS ONE* 11: e0161362.
- Wang S., Giller K., Kreuzer M., Ulbrich S.E., Braun U., Schwarm A. 2017. Contribution of Ruminal Fungi, Archaea, Protozoa, and Bacteria to the Methane Suppression Caused by Oilseed Supplemented Diets. *Frontier of Microbiology* 8: 1864.
- Wright A., Kennedy P., O'Neill C., Toovey A., Popovski S., Rea S., Pimm C.L., Klein L. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* 22: 3976-3985.
- Wright A.D., Toovey A.F., Pimm C.L. 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 12: 134-139.
- 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: 3776-3786.