

Efecto del bromo etano sulfónico (BES) en la población de bacterias metanogénicas y en la fermentación ruminal *in vitro*

Juana Galindo, Niurca González, Areadne Sosa, Yoandra Marrero, R. González, Denia Delgado, Verena Torres, Ana I. Aldana, Onidia Moreira, Juan Cairo, Lucía Sarduy y Aida C. Noda

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana

Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

Para determinar el efecto del bromo etano sulfónico (BES) en la población de metanógenos y fermentación ruminal, se condujo un experimento mediante un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 2 X 3, en condiciones *in vitro*. Se compararon dos tratamientos: A) sin BES (control) y B) con BES. El resto de la dieta experimental consistió en heno de alfalfa (*Medicago sativa*). Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0) y a las 12 y 24 h, después de iniciada la fermentación. Se replicó seis veces en tiempo. Los conteos de bacterias metanogénicas fueron de 16.40 y 17.32 10⁵ (ufc/mL) para los tratamientos sin BES y con BES, respectivamente. El BES redujo a ½ la población de bacterias celulolíticas totales (P < 0.01) y no produjo efectos significativos en la población de protozoos y bacterias viables totales. La concentración de amoníaco fue de 10.83 y 10.92 mmol/L para los tratamientos A y B, respectivamente. La inclusión del BES incrementó (P < 0.05) la concentración de AGCC totales en el rumen. No se encontró efecto del tiempo de muestreo en los grupos de bacterias del rumen. La concentración de AGCC se incrementó con el tiempo de fermentación y sus valores fueron de 41.57, 56.82 y 66.74 mmol/L, antes de incubar, 12 y 24 h después de la incubación, respectivamente. Se concluye que, en las condiciones de este estudio, el BES no actuó directamente en la población de metanógenos, aunque redujo las bacterias celulolíticas. Por estas razones, debe emplearse con cautela en dietas fibrosas, si se desea optimizar la fermentación de la fibra

Palabras clave: *BES, rumen, metanógenos, bacterias celulolíticas, hongos, heno de alfalfa*

Uno de los problemas más acuciantes que enfrenta el mundo en la actualidad es el calentamiento global por el aumento de las emisiones de gases con efecto invernadero (GEI). Estas se deben, fundamentalmente, a la acumulación de gases que atrapan el calor en la atmósfera, calientan la tierra más de lo debido y traen como consecuencia cambios climáticos (Molano *et al.* 2008).

El metano (CH₄) es un potente GEI, ya que su potencial de absorción de la radiación es, aproximadamente, 21 veces superior al del CO₂ (Moss *et al.* 2000). Si bien su concentración con respecto al CO₂ es muy baja, su contribución al efecto invernadero es importante. Asimismo, debido a que su tiempo medio de vida en la atmósfera es corto, las pequeñas disminuciones que se producen pueden ocasionar ventajas ecológicas.

El CH₄ entérico que emiten los rumiantes no es solamente un problema ecológico, sino que representa una gran pérdida de la energía del alimento (Soliva *et al.* 2003), además de disminuir la productividad de los animales. Se conoce que entre 2 y 12 % de la energía bruta que consumen los animales procede de los alimentos y se pierde en forma de metano (Johnson *et al.* 2001).

El proceso de la metanogénesis se desarrolla en diversos hábitats anaerobios y se lleva a cabo por un pequeño y único grupo de bacterias metanogénicas (Mc Allister *et al.* 1996 y Joblin 2004). Los rumiantes producen, aproximadamente, 97 % del metano generado por animales domésticos. El 75 % de esta producción corresponde al ganado bovino y el resto, a otros animales rumiantes (Crutzen *et al.* 1986 y Cavanagh *et al.* 2008).

Para disminuir la producción de metano por parte de los rumiantes, se han desarrollado numerosas estrategias que permiten suprimir la metanogénesis ruminal mediante métodos químicos (Itabashi *et al.* 2000) y biotecnológicos (Mc Allister 1996, Santoso *et al.* 2004 y Waghorn *et al.* 2008). Entre estos se halla el uso de ionóforos (Bagg *et al.* 2000, Buchko *et al.* 2000 y Galindo *et al.* 2005), lípidos (Gill 2004), nitritos, nitratos y sulfatos. También se incluyen los compuestos halogenados homólogos del metano, como el hidrato de cloral, un complejo de bromo-clorometano y ∞ ciclodextrina (Itabashi 2000) y el ácido 2-bromoetano sulfónico (BES) (Martín y Macy 1985).

La utilización de estos agentes inhibidores no debe afectar a las bacterias que degradan la fibra. Por tanto, cuando se evalúa alguno de estos compuestos, es necesario el control de estos microorganismos y de los encargados de sintetizar el metano.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un producto comercial, el bromo etano sulfónico (BES), en la población de metanógenos y en la fermentación ruminal.

Materiales y Métodos

Tratamientos experimentales. Se evaluaron dos tratamientos, según diseño completamente aleatorizado, en arreglo factorial 2 x 3 (dos tratamientos y tres tiempos de muestreo). La dieta base fue heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y su composición química se determinó según AOAC (1995): 12.4; 20.8; 2.53; 36.7; 27.2; 1.55; 0.24 y 0.25 % de cenizas, PB, extracto etéreo, FND, FAD, Ca, P y Mg, respectivamente.

Los tratamientos experimentales fueron: heno de alfalfa (control) y heno de alfalfa+ BES. Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0) y a las 12 y 24 h,

después de iniciada la fermentación. Se replicó seis veces en tiempo.

Procedimiento experimental. Para realizar el experimento, se pesaron 0.2 g de heno de alfalfa (donado por el Dr. Chris Mc Sweeney). La cantidad de BES utilizada correspondió a una concentración final de 0.5 mM. (Protocolo Commun Experiment, Project No. 12667 IAEA). Ambos se adicionaron a las botellas de vidrio correspondientes.

Los animales donantes de líquido ruminal fueron dos toros Holstein, canulados en rumen. Estos se encontraban alojados en cubículos individuales, a la sombra y con libre acceso al agua. Se les extrajo líquido ruminal a través de la cánula, con ayuda de una bomba de vacío. Una vez extraído, se introdujo en un termo que se cerró herméticamente para mantener la temperatura del líquido de rumen (39° C) y las condiciones de anaerobiosis durante su traslado al laboratorio.

Posteriormente, el líquido ruminal (LR) se filtró por muselina para eliminar las partículas del alimento bajo atmósfera constante de CO₂. Las partículas sólidas se batieron, en tres ocasiones, durante 1 min. junto a 30 mL de solución tampón, con intervalos de 1 min. entre cada una. Se utilizó para ello una batidora doméstica, marca Vince deluxe, modelo LZ 500. El batido se filtró por muselina. Se desechó la fracción sólida y la líquida se unió con la que se obtuvo previamente, hasta lograr la fracción de líquido de rumen total (LRT).

Las unidades experimentales consistieron en botellas de vidrio de 150 mL de capacidad. En cada una, se introdujo el material a evaluar y 30 mL de la solución tampón + 10 mL de líquido de rumen total (LRT), de acuerdo con la metodología de Menke y Steingass (1988). Las botellas se sellaron con tapón de butilo y agrafe y se introdujeron en baño de agua, con temperatura controlada a 39° C. En cada corrida experimental se colocó una botella para cada hora y tratamiento.

El pH se midió en pH- metro digital, marca WPA. El amoníaco se calculó según Conway (1957) y los ácidos grasos de cadena corta totales, de acuerdo con Pennington (1952).

Técnicas de cultivo y conteo de microorganismos.

Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (1950), en tubos roll y en condiciones de anaerobiosis estricta.

La siembra de bacterias viables totales y celulolíticas se efectuaron en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificado por Elías (1971) y Galindo (1988). Para determinar la población de hongos se utilizó el medio de cultivo de Joblin (1981). Las bacterias metanogénicas se contaron por el mismo método, pero se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40) en la fase gaseosa. El medio de cultivo fue descrito por Anderson y Horn (1987).

Los protozoos se preservaron en formol al 10 %, en una dilución 1:1 (v/v). Las muestras preservadas se guardaron en refrigerador a 4° C y posteriormente se

contaron en el microscopio óptico, en cámara de Neubauer. Para ello, los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0.01%, en ácido acético glacial al 0.1%.

Tratamiento estadístico a los conteos de microorganismos

El análisis estadístico de los resultados experimentales se realizó de acuerdo con el diseño experimental, con el propósito de identificar interacción entre los tratamientos (niveles de BES) en el tiempo de fermentación (horas de muestreo). En los casos necesarios, se utilizó la dócima de Duncan (1955) para $P < 0.05$. Los conteos de microorganismos se transformaron según Log N, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento.

Para el análisis se aplicó la fórmula $(K+N)/10^x$, donde:

K - constante que representa el logaritmo de la dilución en la que se inoculó el microorganismo.

N - logaritmo del conteo de colonias, determinado como ufc/mL, uft/mL o células/mL

10 - base de los logaritmos

X - dilución donde se efectuó la inoculación

Resultados y Discusión

Diferentes investigadores (Demeyer y Verstraete 1997 y Chiu y Lee 2001) han estudiado el efecto del bromoetano sulfónico (BES) como estimulador de la acetogénesis reductiva e inhibidor selectivo de la metanogénesis en el ecosistema ruminal. En los resultados de este estudio, para las determinaciones realizadas, no se encontró interacción significativa entre los factores, nivel de BES y tiempo de muestreo.

La inclusión del bromoetano sulfónico (BES) no mostró efecto inhibitorio en la población de bacterias viables totales, bacterias metanogénicas, hongos celulolíticos y protozoos del rumen. De igual manera, con el nivel empleado, este producto comercial no produjo cambios en la concentración de amoníaco en el rumen (tabla 1). Sin embargo, incrementó la concentración de AGCC ($P < 0.05$), desde 51.22 hasta 58.87 mmol/L.

Soliva *et al.* (2003) demostraron el efecto moderador de algunos productos comerciales, como el ácido bromoetano sulfónico, en las poblaciones microbianas ruminales responsables de la producción de metano. Sin embargo, en este experimento, no se demostró efecto inhibitorio significativo de este compuesto en las poblaciones metanogénicas.

Si se comparan los resultados de esta investigación con los obtenidos por Delgado *et al.* (2006) y González *et al.* (2006), cuando utilizaron el ácido bromoetano sulfónico (0.5 mM) para evaluar su efecto en la producción de metano en el rumen, puede constatar que el BES redujo la producción de metano en rumen, en condiciones *in vitro*. Esto puede deberse, probablemente, a que su efecto se relaciona con las rutas metabólicas de producción de metano, y no con las concentraciones bacterianas específicas.

Tabla 1. Efecto del BES en los conteos de las poblaciones microbianas y en la concentración de los productos de la fermentación con heno de alfalfa

Medidas	Heno de alfalfa + BES	Heno de alfalfa	EE ± Sign
Bacterias viables totales ¹ , 10 ¹¹ ufc/ mL	2.241 (10.42)	2.30 (10.47)	0.19
Bacterias metanogénicas ¹ , 10 ⁹ ufc/mL	2.47 (17.32)	2.42 (16.40)	0.25
Protozoos ¹ , 10 ² cel/mL	3.51 (44.3)	3.30 (32.33)	0.37
Hongos celulolíticos ¹ , 10 ⁴ uft/mL	2.42 (16.02)	2.30 (10.35)	0.21
NH ₃ , mmol/L	10.92	10.83	0.29
AGCC, mmol/L	58.87	51.22	1.78*

¹Datos transformados según Ln X

() Valores originales

ufc, unidades formadoras de colonias; uft, unidades formadoras de talo.

* P < 0.05

Investigaciones desarrolladas por Wolfe (1982) y Martin y Macy (1985) informaron que el ácido 2-bromoetanosulfónico (BES) es un sustituto de la coenzima F, y actúa como un inhibidor muy específico de la metanogénesis ruminal. Sin embargo, Immig *et al.* (1996) indicaron que, a los pocos días de tratamiento, este compuesto puede desarrollar resistencia en la microbiota ruminal. Es muy probable que este efecto se haya manifestado en este experimento. De cualquier modo, debido a la complejidad de la población responsable de producir metano en el rumen y a sus rutas metabólicas, es necesario profundizar en investigaciones que permitan discernir el mecanismo de acción más probable del BES en el sistema de alimentación utilizado en este estudio.

Los estudios realizados por Demeyer y Verstraete (1997) demostraron que la adición del BES, hasta una concentración final de 0.01-0.03 mM, inhibió la producción de metano y estimuló la producción de AGCC, sin alterar el consumo de acetato, lo que representó una ganancia energética entre 13 y 15 %.

La emisión de metano depende, en gran medida, del consumo y de la composición de la dieta (Gill 2004, Beauchemin y Mc Ginn 2005 y 2006). El ganado sometido a un sistema intensivo de alimentación produce menor cantidad de metano que el de sistemas extensivos. La dieta y el contenido de fibra, principalmente, influyen en la densidad de la población de metanógenos en el rumen. De este modo, en el rumen de animales alimentados con concentrado se encontrará menor cantidad de bacterias metanogénicas que en los alimentados con forraje (Demeyer y Fievez 2000).

A partir de los resultados obtenidos en este experimento, se infiere que el BES parece no tener influencia alguna en los protozoos del rumen. Otros metanógenos se relacionan de manera directa con estos grupos microbianos. Esto se debe a que los metanógenos,

que viven en el interior o adheridos a la superficie de los protozoos ciliados del rumen, son responsables de más de 37 % de las emisiones de metano. En ausencia de protozoos, las emisiones de metano del rumen se reducen a 13 % aproximadamente, lo que varía con la dieta (Hegarty 1999). De ahí que el uso de plantas defaunantes sea otra vía para disminuir los metanógenos. Al respecto, se hacen esfuerzos por reducir la metanogénesis ruminal mediante la defaunación (Hegarty 1999, Broudiscou *et al.* 2000, Hess *et al.* 2003 y Galindo *et al.* 2005)

Es posible que, en concentraciones superiores de BES (0.5mM), se encuentre un efecto supresor más marcado en los microorganismos metanogénicos, aunque sería muy peligroso su utilización a niveles superiores, debido a su efecto directo en la población de bacterias celulolíticas (figura 1). De todas formas, el sustrato de fermentación o tipo de dieta es un factor que debe considerarse.

Un aspecto de interés es que el BES, con el nivel empleado, redujo a ½ la población de bacterias celulolíticas viables (0.5mM). En investigaciones realizadas por González *et al.* (2006) no se encontraron diferencias en la representación de *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*, dos de las bacterias celulolíticas más activas del rumen, determinadas mediante el monitoreo molecular de las poblaciones microbianas del órgano. Es muy probable que con la inclusión del BES se produzca un efecto de disminución en otras poblaciones celuloíticas no evaluadas o que los actuales resultados demuestren la diferencia que existe entre las técnicas convencionales de cultivo y las basadas en la tecnología de genes.

De cualquier manera, entre las bacterias celulolíticas activas se encuentran *Ruminococcus albus*, *Clostridium lockheadii*, *Clostridium cellobiosparum*, y otras no monitoreadas de manera molecular (Galindo *et al.* 2006)

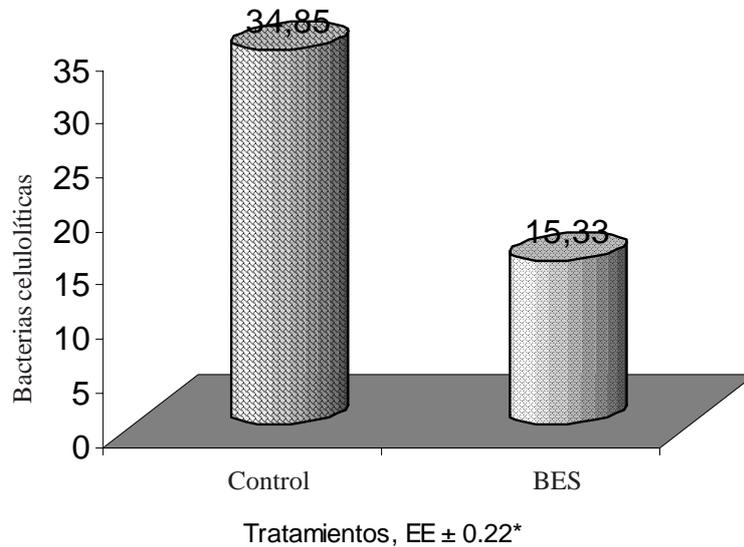


Figura 1. Efecto del BES en la población de bacterias celulolíticas viables (10^5 ufc. mL⁻¹) en animales que consumen heno de alfalfa

El efecto de disminución que se encontró en la población total de bacterias celulolíticas es un aspecto que debe considerarse en futuras investigaciones donde se utilice BES en dietas fibrosas. Este criterio se fundamenta en que uno de los factores que determina la producción de metano en el rumen es la dieta y su forma de suministro (González *et al.* 2006). Prácticas de alimentación que aumenten el consumo y la velocidad de digestión o acorten la estancia de los alimentos en el rumen disminuyen la producción de metano por unidad de forraje digerido. De esa manera, si la dieta es fibrosa, reducciones notables en la digestión de la fibra, incrementarán el tiempo de permanencia de los alimentos en el rumen y se producirá una mayor cantidad de metano.

En este estudio no se encontraron efectos del tiempo de fermentación en las poblaciones de bacterias del rumen ni en la concentración de amoníaco. Sin embargo,

la concentración de ácidos grasos de cadena corta en el rumen (AGCC) se incrementó a medida que transcurrió el tiempo de fermentación (tabla 2).

Es difícil explicar las razones por las que no se encontraron diferencias estadísticas en la población de bacterias metanogénicas, celulolíticas y protozoos con el tiempo de fermentación. Al respecto, debe indicarse que los valores experimentales presentaron una gran dispersión entre muestreos. De cualquier manera, se conocen resultados anteriores en los que estos grupos microbianos se modifican, en dependencia del tiempo posterior a la fermentación.

Se concluye que, en las condiciones experimentales desarrolladas, el BES no actuó directamente en la población de metanógenos, aunque redujo las bacterias celulolíticas, por lo que debe utilizarse con cautela en dietas fibrosas, si se desea optimizar la fermentación de la fibra.

Tabla 2. Comportamiento en el tiempo de los conteos de las poblaciones microbianas y en la concentración de los productos de la fermentación-

Medidas	Hora 0	Hora 12	Hora 24	EE ± Sign
Bacterias viables totales ¹ , 10 ¹¹ ufc. mL ⁻¹	2.08 (8.30)	2.50 (13.08)	2.23 (9.95)	0.23
Bacterias metanogénicas ¹ , 10 ⁵ . mL ⁻¹	2.17 (9.30)	3.41 (48.63)	2.74 (22.65)	0.31
Bacterias celulolíticas ¹ , 10 ⁶ ufc. mL ⁻¹	2.64 (15.48)	3.09 (31.48)	3.25 (28.33)	0.27
Hongos celulolíticos ¹ , 10 ⁴ ufc. mL ⁻¹	2.42 (12.87)	2.30 (10.12)	2.32 (10.92)	0.25
Protozoos ¹ , 10 ² cel. mL ⁻¹	3.66 (39.88)	2.79 (25.05)	3.78 (50.03)	0.45
NH ₃ , mmol. L ⁻¹	11.05	10.06	11.51	5.99
AGCC, mmol. L ⁻¹	41.57 ^a	56.82 ^b	66.74 ^c	2.18**

^{a, b, c} Medias con letras diferentes dentro de la misma fila, difieren a P < 0.05 (Duncan 1955)

¹Datos transformados según ln X; medias originales entre paréntesis.

** P < 0.01

Agradecimientos

Se agradece a la Organización Internacional de la Energía Atómica por financiar todas las investigaciones desarrolladas, lo que contribuirá a mitigar las emanaciones de metano entérico al ambiente, así como a elevar la eficiencia de utilización de la energía.

Referencias

- AOAC 1995. Official Methods of Analysis. 15th Edition. Ass.Off. Anal. Chem. Arlington, V.A.
- Anderson, M.A. & Horn, G.M. 1987. Effect of Lasalocic in wheight gain, ruminal fermentation and forage intake of stocker cattle grazing wintwer pasture. *J. Anim.Sci.* 65:865
- Bagg, R., Vessie, G., Wilson, J. & Dick, D. 2000. Comparison of the effects of monensin and decoquinatate on feed intake and growth performance in dairy calves to weaning age. *Can. J. Anim. Sci.* 80:721
- Beauchemin, K.A. & Mc Ginn, S.M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83:653
- Beauchemin, K.A. & McGinn, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84:1489
- Broudiscou, L.P., Papon, Y. & Broudiscou, A.F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Sci.Tech.* 87:263
- Buchko, S. J., Holley, R. A., Mc Allister, T. A., Mc Mahon, L. R. & Veira, D. M. 2000. Effect of monensin on *E. coli* 0157:H₇ and *E. Coli* ATCC 25922. Abstracts Tech. *Can. J. Anim. Sci.* 80:721
- Cavanagh, A., Mc Naughton L., Clark, H., Gowan, C., Pinares-Patino, C., Dalley, D., Vlaming, B. & Molano, J.M. 2008. Methane emissions from grazing Jersey x Friesian dairy cows in mid lactation. *Australian J. Exp. Agric.* 48:230
- Chiu P.C. & Lee, M. 2001. 2-Bromoethanesulfonate Affects Bacteria in a Trichloroethene-Dechlorinating Culture. *Appl. Environmental Microbiology* 67: 2371
- Conway, D.R. Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. 4th Edition Crosby Lockwood and Sons, Ltd. London
- Crutzen, P. J., Aselmann, I. & Seller, W., 1986. Methane production by domestic's animals, wild ruminants, other herbivorous fauna and humans. *Tellus* 388: 271
- Delgado, D., Galindo, J., González, N., González, R. & Cairo, J. 2006. Effect of bromoethane sulfonic acid (BES) on methanogenesis and microbial variation by using real time PCR and *in vitro* gas production test. (Commun experiment). Partial Report. Project No. 12667. IAEA
- Demeyer, D.L. & Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Ann. Zootech.* 49:95
- Demeyer, D. & Verstraete, W. 1997. Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:194
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. *Biometrics* 11:1
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high-molasses urea diet. Thesis PhD. Aberdeen
- Galindo, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje. Tesis PhD. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba
- Galindo, J., Scull, I., Delgado, D., González, N., Marrero Y., Febles, G., Ruiz, T., Sosa, A., Aldana, I., Moreira, O., Torres, V., Sarduy, L., Noda, A. Achang, G., Chongo, B & Pedraza, R. 2006. Efecto de los metabolitos secundarios de árboles, arbustos y otras leguminosas como agentes defaunantes del rumen y su repercusión en el metabolismo energético de los rumiantes. Informe técnico, ICA. La Habana, Cuba
- Galindo, J., Sosa, A., González, N., Delgado, D., González, R., Aldana, A. I., Moreira, O., Cueto, M. & Cairo, J. 2005. Effect of ruminal fermentation activator on the on the population of protozoa, methanogenic and cellulolytic bacteria and fungi in the rumen. Informe técnico OIEA
- Gill, S.B., 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feedlot). Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. Disponible: <<http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm>>. Consultado: 4 de agosto de 2004
- González, N., Galindo, J., González, R., Sosa, A., Moreira, O., Delgado, D., Martín, E. & Sanabria, C. 2006. Utilización de la técnica PCR en tiempo real y de la producción de gas *in vitro* para determinar el efecto del bromoetano sulfónico (BES) en la metanogénesis y la población microbiana ruminal. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 40:183
- Hegarty, R.S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agr. Res.* 50:1321
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Díaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R. & Machmüller, A. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Sci. Tech.* 109:4
- Hungate, R. G. 1950. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacterial Ref.* 14:1
- Immig, I., Demeyer, D., Fiedler, D., Van Nevel, C. & Mbanzamihiago, L. 1996. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Arch. Tierernahr.* 49:363
- Itabashi, H., Bayaru, E., Kanda, S., Nishida, T., Ando, S., Ishida, M., Itoh, T., Isobe, Y. & Nagara, K. 2000. Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility in cattle. The 3rd Joint Symposium of Japan and Korea on Rumen Metabolism and Physiology. 11:72. Miyazaki, Japan
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environ. Microb.* p. 1119
- Joblin, K.N. 2004. Methanogenic Archaea. I Planning Meeting of Project Contract Research and Training Workshop «Development and Use of Rumen Molecular Techniques for Predicting and Enhancing Productivity». Brisbane, Australia
- Johnson, D.E., Johnson, K.A., Ward, G.M. & Branine, M.E. 2001. Ruminants and other animals. Chapter 8. En: Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment. Ed. M.A.K. Khalil, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Germany. p. 112
- Martin, S.A. & Macy, J.M. 1985. Effects of monensin, pyromellitic diimide and 2-bromoethanosulfonic acid on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 60:544
- McAllister, T.A., Okine, E.K., Mathison, G.W. & Cheng, K.J. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76:23

- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T. & Colombatto, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82:3346
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Div.* 28:7
- Molano, G., Knight, T.W. & Clark, H. 2008. Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian J. Experimental Agric.* 48:165
- Moss, A.R., Jouany, J.P. & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231
- Pennington, R. J. 1952. The metabolism of short chain fatty acids in the sheep. I. Fatty acids utilization by rumen epithelium on other tissues. *Biochem. J.* 51:251
- Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 43, Número 1, 2009.
- Santoso, B., Mwenya, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H. & Takahashi, J. 2004. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livestock Production Sci.* 91:209
- Soliva, C., Hess, R., Meile, H. Kreuzer, D. & Machmüller, M. 2003. Suppression of ruminal methanogenesis by dietary means: apparent inconsistency between methane release and counts of microbes involved in methanogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 3: 209
- Waghorn, G.C., Crark, H., Taufaa, V. & Cavanagh, A. 2008. Monensin controlled-release capsules for methane mitigation in pasture- fed dairy cows. *Australian J. Experimental Agric.* 48:65
- Wolfe, R.S. 1982. Biochemistry of metanogenesis. *Experientia.* 38:198

Recibido: 8 de agosto de 2008