

Efecto del aceite de coco en la población de bacterias metanogénicas y su relación con otros grupos microbianos del rumen en condiciones *in vitro*.

Juana Galindo, Niurca González, Denia Delgado, Areadne Sosa, R. González, Verena Torres, Ana Irma Aldana, Onidia Moreira, Lucía Sarduy, Aida C. Noda y J. Cáiro

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

Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

La producción de metano en el rumen se produce a partir de la fermentación de los carbohidratos por una población microbiana mixta integrada por metanógenos, donde participan además otros grupos de bacterias y protozoos. Para evaluar el efecto del aceite de coco en la población de bacterias metanogénicas y su relación con otros grupos microbianos, se condujo un experimento en condiciones *in vitro*, para lo que se emplearon tres niveles de inclusión de aceite de coco en el concentrado: A) control (sin aceite de coco), B) 7.5 % de aceite de coco y C) 15 % de aceite de coco. La dieta base consistió en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) y el diseño experimental fue completamente aleatorizado con arreglo factorial. Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0) y a las 2 y 4 h después de iniciada la fermentación. Se replicó 6 veces en tiempo. Los conteos de bacterias metanogénicas fueron 18.02, 8.48 y 6.96 10^9 ufc/mL. La población de bacterias celulolíticas fue 22.38, 23.81 y 14.00 10^6 ufc/mL para los tratamientos sin aceite de coco en el concentrado, 7.5 y 15 %, respectivamente. No hubo efecto significativo del aceite de coco en las poblaciones de bacterias viables totales, hongos celulolíticos, pH y amoníaco. No hubo efecto del tiempo de muestreo en los grupos de bacterias del rumen. Se concluye que la inclusión de 7.5 y 15 % de aceite de coco en el concentrado reduce la población de bacterias metanogénicas. Se recomiendan trabajos futuros que permitan evaluar diferentes niveles de aceite de coco en la ración.

Palabras clave: aceite de coco, rumen, bacterias metanogénicas, bacterias celulolíticas, hongos.

La metanogénesis es resultado de la fermentación de los carbohidratos en el rumen (McAllister *et al.* 1996), proceso ineficiente que produce pérdidas de 2-12 % de la energía bruta que consumen los animales rumiantes (Bryant 1979). Además de las consecuencias para el animal, ocasiona daños al ambiente (Zinder 1992, Johnson y Johnson 1995, Johnson *et al.* 2000 y Soliva *et al.* 2004).

Se estima que los microorganismos del rumen producen de 300-600 L de metano por animal al año en ganado adulto. Esto representa, aproximadamente, 80 000 000 t al año. Este gas es uno de los que más contribuyen al efecto invernadero y es responsable de este fenómeno en 18-21 % (Moss 1992 y Moss *et al.* 2000). Por estas razones, reducir su producción proporciona beneficios económicos y medio ambientales (Teferedegne 2000).

Para reducir la producción de metano en el rumen se han utilizado diferentes vías (Demeyer y Fievez 2000, Anderson *et al.* 2003, Carmona *et al.* 2005 y Beauchemin *et al.* 2008). Una de las más utilizadas es el uso de aditivos químicos, entre los que se encuentran análogos halogenados de metano, antibióticos ionóforos, ácidos grasos insaturados, ácido fumárico y otros compuestos que tienen efectos directos o indirectos en la metanogénesis ruminal. Todas estas sustancias disminuyen significativamente la producción de metano. Se ha demostrado su efecto en condiciones *in vitro* y en animales en producción (Santoso *et al.* 2004). Otra de las vías que se han empleado consiste en metabolitos secundarios de los vegetales (Fievez *et al.* 2001, Greathead 2003 y Galindo 2004).

Los ácidos grasos tienen efecto tóxico en las bacterias metanogénicas. Los inhibidores de metanogénesis más efectivos incluyen ácidos grasos como linoleico y ácido

cis-oleico y algunos ácidos grasos saturados como esteárico. Se recomienda también el empleo de mezclas de ácido mirístico y laúrico. Entre los aceites, los que más se emplean son los de linaza, coco, canola, rábano, girasol y aceites de pescado, basados en ácido n-3-eicosapentanoico (EPA) y ácido n-3-docosahexanoico (DHA)) (Demeyer y van Nevel 1979, Gil 2004, Soliva *et al.* 2004, Beauchemin y McGinn 2006 y Beauchemin *et al.* 2008).

El aceite de coco se ha informado como un producto capaz de inhibir la metanogénesis, debido a su contenido elevado de ácidos grasos de cadena larga. Su contenido en ácidos grasos saturados es aproximadamente de 90 %. Su composición media en ácidos grasos es: mirístico (17 %), palmítico (9 %), esteárico (2.5 %), oleico (7 %), linoleico (1.8 %) (Blas *et al.* 2003).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del aceite de coco en la población de bacterias metanogénicas y su relación con otros grupos microbianos en condiciones *in vitro*.

Materiales y Métodos

Tratamientos experimentales. Se evaluaron tres tratamientos, según diseño completamente aleatorizado, en arreglo factorial (3 x 3). Los tratamientos se diseñaron de acuerdo con el nivel de aceite de coco en el concentrado: 1) pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), 2) pasto estrella + 7.5 % de aceite de coco y 3) pasto estrella + 15 % de aceite de coco. Los niveles de aceite de coco representaron 3.5 y 7 % de la concentración de grasa de la dieta total.

Para la inclusión del aceite de coco en la ración se diseñaron tres suplementos concentrados. La tabla 1 muestra la composición de estos suplementos.

Tabla 1. Composición de los suplementos concentrados con aceite de coco

Composición, %	Nivel de aceite de coco, %		
	0	7.5	15
Harina de soya	49.0	50.9	52.8
Harina de maíz	46.3	36.9	27.4
Aceite de coco	0.0	7.5	15.0
Carbonato di cálcico	0.4	0.45	0.5
Fosfato di cálcico	0.4	0.35	0.3
Zeolita	2.0	2.0	2.0
Cloruro de sodio	1.0	1.0	1.0
Premezcla mineral ¹	1.0	1.0	1.0
EM, MJ/kg de MS	12.55	13.39	14.02
PB	28.2	28.2	28.2
FDN	30.10	25.7	21.20
Ca	1.62	1.27	0.92
P	0.86	0.81	0.75

¹. Contiene (g/kg): 500 Ca HPO₄; 400 Na Cl; 20 Zn CO₃; 27 Fe SO₄ 5 H₂O; 23 Mn SO₄; 10 Cu SO₄ 5 H₂O; 0.1 Co SO₄ 7 H₂O; 0.1 K Cl y 19 maíz

El resto de la dieta experimental consistió en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Su composición química (% de MS) fue 94.20; 7.26; 74.57; 10.11; 0.42 y 0.18 para la MS residual; PB; FDN; ceniza; calcio y fósforo, respectivamente (AOAC 1995).

Procedimiento experimental. El experimento se condujo en condiciones *in vitro*, para lo que se utilizó la técnica de Theodorou *et al.* (1994), donde se utilizan botellas selladas de 100 mL para incubar las muestras de alimento en líquido ruminal y un medio tampón.

En cada botella se introdujeron 30 mL de la mezcla integrada por líquido de rumen y solución tampón en relación 1:3. Los frascos de fermentación se esterilizaron previamente a 121 °C y 1.5 a.t.m. durante 15 min. Contenían 0.3 g de material para evaluar en base seca (BS). El procedimiento se realizó en atmósfera de CO₂ para garantizar las condiciones de estricta anaerobiosis.

El inóculo ruminal se obtuvo a partir de tres toros mestizos estabulados y canulados en rumen, alimentados con una dieta de forraje de gramíneas sin suplementación adicional y con libre acceso al agua. La muestra de líquido ruminal se colectó a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío. Se conservó en un termo **herméticamente cerrado hasta su traslado al laboratorio** de microbiología y genética molecular del rumen, en el Instituto de Ciencia Animal, donde posteriormente se filtró a través de muselina. Para conformar la mezcla que se iba a fermentar, se utilizó el pool de líquido ruminal de los tres toros, con el propósito de eliminar el efecto animal.

Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0) y a las 2 y 4 h después de iniciada la fermentación para las poblaciones de microorganismos, y a las 0, 2, 4, 6 y 24 h para los indicadores de pH y concentración de amoníaco. Se replicó seis veces en tiempo.

El pH se midió en pH- metro digital, marca WPA.

Técnicas de cultivo y conteos 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 efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificado por Elías (1971) y Galindo (1988). Para la determinación de la población fungal 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 el descrito por Anderson y Horn (1987).**

Los protozoos se preservaron en formol a 10 %, en una dilución 1:1 (v/v). Las muestras preservadas se guardaron en refrigerador a 4 °C. Posteriormente se contaron al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para esto, los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0.01% en ácido acético glacial al 1 %.

Tratamiento estadístico a los conteos de microorganismos. El análisis estadístico de los resultados experimentales se realizó de acuerdo con el diseño experimental que se empleó. Se utilizaron métodos multivariados para identificar la interacción entre los tratamientos (niveles de aceite de coco) y los tiempos de fermentación (horas de muestreo). En los casos necesarios, se utilizó la dócima de Duncan para $P < 0.05$.

Los conteos de microorganismos se transformaron según $\ln N$, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis se aplicó la fórmula $(K+N) \cdot 10^X$, 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 a la que se efectuó la inoculación

Resultados

No hubo interacción significativa entre los niveles de aceite de coco y el tiempo de fermentación. La tabla 2 muestra el efecto de la inclusión de aceite de coco en la población microbiana ruminal.

El aceite de coco no produjo modificaciones en la población de bacterias viables totales ni en la representación en bacterias y hongos celulolíticos ruminales. Sin embargo, la inclusión de 7.5 % de aceite de coco en el suplemento (3.5 % de la grasa total en la dieta) redujo de manera significativa la población de metanógenos. No se encontró efecto significativo en la población de protozoos del rumen.

El pH y la concentración de amoníaco en el líquido de rumen no se afectaron debido a la presencia de aceite de coco en el suplemento (tabla 3).

La población de bacterias viables totales se incrementó a las 4 h de incubación a 39 °C, aunque

Tabla 2. Efecto de la dosis de aceite de coco en la población microbiana ruminal *in vitro*.

Indicador	Dosis de aceite de coco, %			EE± signif
	0	7.5	15	
Bacterias totales viables, 10 ¹¹ ufc/mL	2.75 (24.57)	2.99 (30.79)	2.54 (19.78)	0.28
Bacterias metanogénicas, 10 ⁵ ufc/mL	2.74 ^b (18.02)	1.80 ^a (8.48)	1.56 ^a (6.96)	0.22 **
Bacterias celulolíticas, 10 ⁶ ufc/mL	2.79 (22.38)	2.93 (23.81)	2.46 (14.0)	0.21
Hongos x 10 ⁵ uft/mL	2.54 (18.02)	2.85 (8.48)	2.70 (6.96)	0.22
Protozoos, 10 ⁵ células/mL	2.71 (22.83)	2.51 (18.64)	2.37 (14.52)	0.20

^{ab} Valores con letras no comunes por fila difieren a P < 0.05 (Duncan 1955). Ufc. Unidades formadoras de colonias, uft unidades formadoras de talos. Datos transformados según Ln X. Medias originales entre paréntesis

Tabla 3. Efecto del nivel de aceite de coco en el pH y concentración de amoníaco en el rumen

Medida	Nivel de aceite de coco, %			EE ± sign
	0	7.5	15	
pH	6.62	6.51	6.56	0.05
NH ₃ , mmol/L	190.65	195.15	198.60	12.00

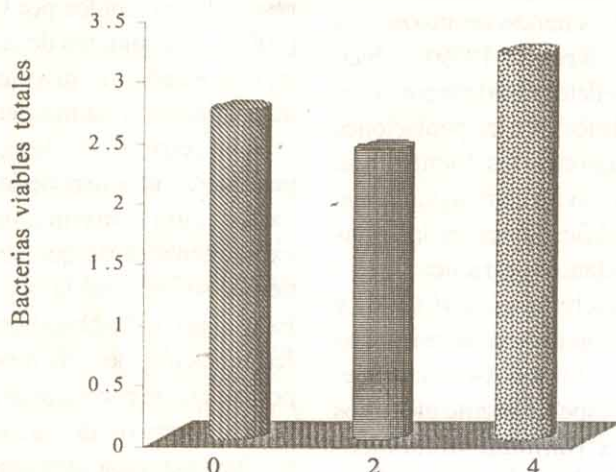


Figura 1. Modificaciones de la población de bacterias viables totales, 10¹¹ ufc/mL en el tiempo de fermentación (EE ± 0.21)*

a las 2 h su población fue intermedia entre el valor encontrado antes de iniciar la fermentación y el que se obtuvo a las 4 h. La figura 1 muestra este efecto.

No se observaron diferencias a las 2 y 4 h posteriores al inicio de la fermentación en las poblaciones de bacterias metanogénicas, celulolíticas y hongos celulolíticos (tabla 4).

El pH del rumen y la concentración de amoníaco se modificaron en el tiempo de fermentación (tabla 5). A las 24 h después de iniciada la fermentación, el pH fue más bajo y la concentración de amoníaco fue superior. Desafortunadamente, no pudo determinarse la concentración de ácidos grasos de cadena corta, lo que ayudaría a buscar la explicación a este efecto.

Tabla 4. Efecto del tiempo de fermentación en las poblaciones de bacterias metanogénicas, hongos y bacterias celulolíticas en condiciones *in vitro*

Indicador	Tiempo de fermentación, h			EE± sign
	0	2	4	
Bacterias metanogénicas, 10 ⁵ ufc/ mL	2.38 (14.09)	1.94 (10.71)	1.77 (8.73)	0.25
Bacterias celulolíticas, 10 ⁶ ufc/mL	2.51 (17.55)	2.70 (18.31)	2.98 (24.33)	0.21
Hongos celulolíticos, 10 ⁵ uft/mL	2.96 (24.11)	2.48 (16.38)	2.66 (17.19)	0.21

Ufc. Unidades formadoras de colonias; uft unidades formadoras de talos. Datos transformados según Ln X, medias originales entre paréntesis

Tabla 5. Efecto del tiempo de fermentación en el pH y concentración de amoníaco *in vitro*.

Medida	0	2	4	6	24	EE ± sign
pH	6.72 ^a	6.59 ^a	6.64 ^a	6.54 ^a	6.33 ^b	0.06***
NH ₃ , mmol/L	141.30 ^d	164.25 ^{cd}	192.30 ^{bc}	207.15 ^b	269.10 ^a	9.00***

^{abcd} Valores con letras no comunes por fila difieren a P < 0.05 (Duncan 1955) ***P < 0.001

Discusión

La reducción de la población de metanógenos ruminales en 47.05 y 38.62 %, cuando se utilizó 7.5 y 15 % de aceite de coco en el concentrado demuestra las potencialidades de esta fuente como posible agente reductor de la metanogénesis ruminal.

Beauchemin *et al.* (2008) informaron que existen diferencias marcadas en la respuesta a la suplementación con fuentes de lípidos, con respecto a la reducción de la producción de metano en el rumen. Estas dependen de la dieta base y del nivel. Ocurrieron reducciones en la producción de metano en 63.8 %, cuando se utilizó 7 % de aceite de coco (Machmuller y Kreuzer 1999). Si bien en los estudios desarrollados no se determinó la producción de metano *in vitro*, fue evidente el efecto en las poblaciones metanogénicas, aunque en ocasiones las fuentes que reducen la producción de metano no afectan la población de metanógenos por ejercer modificaciones en las rutas bioquímicas de producción de metano en el rumen.

En estudios realizados por Machmuller *et al.* (2001 y 2003) se demostró que la inclusión de aceites refinados que contienen ácidos grasos (C 12:0 y C 14:0) como el aceite de coco y el de palma son especialmente efectivos para reducir la metanogénesis ruminal, fundamentalmente en dietas con concentrados y bajas en calcio. Su mecanismo probable es por medio de la toxicidad sobre las bacterias metanogénicas.

Mc Ginn *et al.* (2004) y Beauchemin *et al.* (2007) coincidieron en afirmar que el efecto de los lípidos que contienen ácidos grasos saturados como el aceite de coco reduce la producción de metano en el rumen, como resultado de su acción directa en la digestibilidad de la fibra. En esta investigación se encontraron 8.38×10^6 ufc/mL menos de bacterias celulolíticas que cuando se incluyó 15 % de aceite de coco en el concentrado.

Estos resultados coinciden con Delgado *et al.* (2007), quienes encontraron reducciones en la digestibilidad de la MS cuando evaluó estos concentrados. La falta de diferencias estadísticas en la población de hongos celulolíticos puede ser resultado de una alta variabilidad en la información, aún cuando la inclusión de 15 % de aceite de coco redujo 1/3 a la población de hongos del rumen.

A pesar de no encontrar diferencias en la población de protozoos del rumen cuando se incluyó aceite de coco en la ración (22.83; 18.64 y 14.52. 10^5 células. mL⁻¹ para los niveles 0; 7.5 y 15% en el concentrado, respectivamente), la reducción en 4.19 y 8.31. 10^5 células/mL en los dos niveles de aceite de coco es de gran importancia biológica. Algunos metanógenos mantienen relaciones

ecto y endosimbióticas con los protozoos del rumen y, presumiblemente, pueden utilizar el H₂ que se produce en los hidrogenosomas de los protozoos para producir metano (Vogels *et al.* 1980 y Hirt 1994). Esto puede modificar la degradación de la fracción fibrosa y los productos finales de la fermentación (Attwood y McSweeney 2008).

La dinámica de las poblaciones microbianas en el rumen se modifica según el tiempo post pandreal. El incremento en el número total de bacterias viables a las 4 h después de iniciada la fermentación era de esperar, y coincide con resultados obtenidos por Galindo (1988) y Galindo *et al.* (2005). La evolución de las demás poblaciones estudiadas en este estudio no tuvo una respuesta lógica, por lo que investigaciones futuras deben profundizar en este aspecto.

Con respecto al descenso del pH ruminal a las 24 h posteriores al inicio de la fermentación no se tiene una explicación convincente, a partir de los resultados experimentales de que se dispone, ya que a ese mismo tiempo se encontró la mayor concentración de amoníaco. Este, al no poder absorberse, debido al sistema *in vitro* de fermentación, debería producir incrementos en el pH. Es posible que se encontraran incrementos en la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a un nivel que resultara imposible tamponar el sistema, aspecto que también debe ser estudiado.

Los resultados de este trabajo coinciden con los informados por Machmüller y Kreuzer (1999), Machmüller *et al.* (2001) y Machmüller *et al.* (2003), quienes encontraron que la suplementación con ácidos grasos de cadena media o aceites vegetales como el de coco, girasol (McGinn *et al.* 2004), pescado u oliva (Ungerfeld *et al.* 2003) reduce las emisiones de metano mediante la competencia por equivalentes reductores con los microorganismos metanogénicos o por el efecto tóxico directo en los microorganismos ruminales. Es evidente el efecto indirecto, debido a la reducción de la población de protozoos del rumen, la cual mantiene relaciones simbióticas con los microorganismos metanogénicos.

Se concluye que la inclusión de 7.5 y 15 % de aceite de coco en el concentrado reduce la población de bacterias productoras de metano. Se recomienda desarrollar trabajos futuros que permitan evaluar diferentes niveles de aceite de coco en la ración.

Referencias

- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 15th Ed. Assoc. Official 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 winter pasture. *J. Animal Sci.* 65:865
- Anderson, R.C., Callaway, T.R., Van Kessel, J.A.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S. & Nisbet, D.J. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresource Technology.* 90:59
- Attwood, G. & McSweeney, C. 2008. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H₂ utilisation in the rumen. *Australian J. Exp. Agric.* 48:28
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., Mara, F. & McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement's review. *Australian J. Experimental Agric.* 48:21
- 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
- Beauchemin, K.A., Mc Ginn, S.M. & Petit, H. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal science* 87:431
- Blas, C., Mateos, G.G. & Rebollar, P.G. 2003. Composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. Tablas FEDNA. Segunda Edición. Ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp.
- Bryant, M.P. 1979. Microbial methane production: Theoretical aspect. *J. Anim. Sci.* 48:193
- Caldwell, D. R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14:794
- Carmona, J.C., Bolívar, D.M. & Giraldo, L. A. 2005. El gas metano en la producción ganadera. Alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev. Coloma. Cienc. Pec.* 18:49
- Delgado, D., Galindo, J. & González, N. 2007. Development and use of Rumen Molecular Techniques for predicting and enhancing livestock productivity through a reduction in rumen methane. Partial report. AIEA. Anim. Sci. Institute
- Demeyer, D.L. & Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Ann. Zootech.* 49:95
- Demeyer, D.I. & Van Nevel, C.J. 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* 42:515
- Duncan, D.E. 1955. Multiple ranges and multiple F. test. *Biometrics* 11:1
- Eliás, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high-molasses urea diet. Thesis PhD. Aberdeen
- Fievez, V., Mbanzamihigo, L., Piattoni, F. & Demeyer, D. 2001. *Clover saponins* as methane inhibitors and their effect on rumen utilisation efficiency as studied *in vitro* and *in vivo*. *Meded Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.* 66
- Galindo, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje. Tesis de Dr. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba
- Galindo, J. 2004. Fermentación microbiana ruminal y pasaje hacia las partes bajas del tracto gastrointestinal de árboles, arbustos y leguminosas. Memorias del Curso «Sistemas Sivopastoriles, una opción sustentable». Tantakín, Mérida. México. p. 132
- 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 AIEA. Anim. Sci. Institute. La Habana, Cuba
- Gil, S.B. 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feed lot). Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. En: <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm>. Consultado: 4 de agosto de 2004
- Greathead, H., 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62:279
- Hirt, R.P. 1994. Some rumen ciliates have endo-symbiotic methanogens. *FEMS Microbiol. Letters* 117:157
- Hungate, R. G. 1950. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacterial Ref. Vol.* 14
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environ. Microb.* p. 1119
- Johnson, K.A. & Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483
- Johnson, D.E., Johnson, K.A., Ward, G.M. & Branine, M.E. 2000. Ruminants and other animals. Cap. 8. En: *Atmospheric Methane: It's Role in the Global Environment*. Ed. M.A.K. Khalil and Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. p. 112
- Machmüller, A., Dohme, F., Soliva, C. R., Wanner, C. & Kreuzer, M. 2001. Diet composition affects the level of ruminal methane suppression by medium-chain fatty acids. *Aust. J. Agric. Res.* 52:713
- Machmüller, A. & Kreuzer, M. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 79:65
- Machmüller, A., Soliva, C. R. & Kreuzer, M. 2003. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage production. *Brit. J. Nutr.* 90: 529
- 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
- Moss, A. 1992. Methane from ruminants in relation to global warming. *Chemistry and Industry*, May 4, No 9. p. 334.
- Moss, A.R., Jouany, J.P. & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231
- Santoso, B., B. Mwenya, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi, & J. Takahashi. 2004. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Liv. Prod. Sci.* 91: 209
- Soliva, C.R., Meile, L., Hindrichsen, I.K., Kreuzer, M. & Machmüller, A. 2004. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. *Anaerobe.* 10:269
- Teferedegne, B., 2000. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 59:209
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 48:185

