

## INHIBICIÓN IN VITRO DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL DE UNA DIETA ALTA EN GRANO CON LOVASTATINA

In vitro inhibition of rumen methanogenesis of a high-grain diet using lovastatin

Amaury ÁBREGO-GARCÍA<sup>1</sup>, Héctor Mario POGGI-VARALDO<sup>1\*</sup>, Vania Shuhua ROBLES-GONZÁLEZ<sup>2</sup>,  
Elvira RÍOS-LEAL<sup>1</sup>, Teresa PONCE-NOYOLA<sup>1</sup>, Graciano CALVA-CALVA<sup>1</sup>,  
Daniel Alfonso ESTRADA-BÁRCENAS<sup>3</sup> y Alfredo MENDOZA-VARGAS<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, México.

<sup>2</sup> Instituto de Hidrología, Universidad Tecnológica de la Mixteca, km 2.5 carretera a Acatlima, 69000 Huajuapán de León, Oaxaca, México.

<sup>3</sup> Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, México.

<sup>4</sup> Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14809 Ciudad de México, México.

\*Autor para correspondencia: [lazarillodetormes1001@gmail.com](mailto:lazarillodetormes1001@gmail.com)

*(Recibido: marzo de 2021; aceptado: enero de 2022)*

Palabras clave: ácido bromoetano sulfónico, metano, monensina, rumen.

### RESUMEN

Uno de los mayores impactos ambientales de la ganadería es la emisión de metano entérico, un potente gas de efecto invernadero. En este contexto, se han evaluado algunos compuestos antimetanogénicos tales como la lovastatina (LOV), un inhibidor de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa, enzima clave para la síntesis de membrana en arqueas metanogénicas. Esta podría ser una opción para mitigar las emisiones de metano ruminal. Sin embargo, los experimentos in vitro son escasos y no existe un criterio general sobre la mitigación de metano con LOV en estas condiciones. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto in vitro de la LOV sobre la metanogénesis y características de la fermentación ruminal, así como comparar los resultados con aquellos de la monensina (MON) y el ácido bromoetano sulfónico (BES). Se realizó una prueba in vitro en lote. Se utilizó una ración alta en grano, fluido ruminal de bovinos y tres inhibidores metanogénicos. El diseño experimental fue completamente al azar con tres tratamientos (LOV, MON, BES) y un testigo sin inhibidor. En este trabajo la LOV mostró efectos alentadores sobre la mitigación de la metanogénesis en la fermentación ruminal (43.56 %) sin afectar la producción total y perfil de AGV. Sin embargo, la dosis para obtener este resultado fue mayor en comparación con las de los otros tratamientos. La MON fue la más efectiva con relación a la concentración/inhibición de la metanogénesis, seguida del BES. Ambos tratamientos presentaron cambios en el perfil de AGV.

Key words: bromoethane sulfonic acid, methane, monensin, rumen.

## ABSTRACT

One of the greatest environmental impacts from livestock is caused by enteric methane emissions, a powerful greenhouse gas. In this context, some anti-methanogenic compounds have been evaluated, such as lovastatin (LOV), which is a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, a key enzyme for membrane synthesis of methanogenic archaea. This could be an option to mitigate methane emissions from ruminants. However, there are few in vitro studies and there is no general agreement about the methane mitigation by LOV under these conditions. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of LOV on in vitro methanogenesis and fermentation characteristics in comparison with monensin (MON) and bromoethane sulfonic acid (BES). An in vitro batch incubation was carried out using a high-grain diet and bovine rumen fluid. The experimental design was completely randomized with three treatments, LOV, MON, BES, and a control with no inhibitor. The results demonstrated a favorable effect of LOV on rumen fermentation pattern in terms of methane mitigation (43.56 % inhibition) without affecting the volatile fatty acids (VFA) profile. However, the dose of LOV to obtain this result was very high compared to the doses used in the other treatments. MON was the most effective treatment based on the concentration/inhibition of methanogenesis, followed by the BES; although, both compounds were associated to changes in the VFA profile.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente hay una necesidad inaplazable de desarrollar estrategias para mitigar las emisiones de metano entérico emitidas por rumiantes. En este contexto, a nivel mundial los gases de efecto invernadero (GEI) derivados de la producción ganadera representan ~14.5 % del total de emisiones antropogénicas (Gerber et al. 2013). El metano es uno de los GEI con mayor impacto ambiental de este sector (Grossi et al. 2019, Saunio et al. 2020). En México, de acuerdo con el Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero (INECC 2018), las emisiones de CH<sub>4</sub> por fermentación entérica de bovinos, ovinos y caprinos fueron de 81 330.93 Gg de CO<sub>2</sub>e. Esto representa el 80 % del metano total generado en la categoría agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra de este inventario.

Consecuentemente, se han evaluado algunos compuestos e inhibidores enzimáticos de la metanogénesis ruminal, entre los que destacan: i) análogos de la coenzima M: ácido bromoetano sulfónico (BES), 2-cloroetanosulfonato y 3-bromopropanosulfonato (Liu et al. 2011); ii) inhibidores de la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa: lovastatina (LOV) y mevastatina (Miller y Wollin 2001); iii) inhibidores de bacterias productoras de hidrógeno: ionóforos y bacteriocinas (Patra et al. 2017).

Se ha reportado que el BES es un potente inhibidor de arqueas metanogénicas. No obstante, algunos metanógenos en cultivo puro (*M. mazei* y *M. mobile*) pueden resistir diferentes dosis de BES (Ungerfeld et

al. 2004). La monensina (MON) es uno de los ionóforos más comunes en la producción de bovinos; entre sus ventajas se encuentra generalmente un aumento en la proporción molar de propionato relacionado con la mitigación de metano ruminal (Bagheri et al. 2018). Sin embargo, los riesgos por resistencia cruzada de este tipo de ionóforos no se han determinado por completo (Wong 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que la LOV tiene efecto antimetanogénico específico sobre cultivos puros de metanógenos del rumen y del sistema digestivo de seres humanos (Miller y Wollin 2001, Demonfort-Nkamga et al. 2017). Sin embargo, los resultados de fermentaciones in vitro con LOV pura, fluido ruminal (consorcios microbianos) y dietas para rumiantes (sustratos complejos) son escasos; además, no existe un criterio general sobre la mitigación de metano asociada a este inhibidor (Busquet et al. 2005, Soliva et al. 2011, O'Brien et al. 2013).

Una limitante de la LOV en la alimentación de rumiantes es su costo: 7.5 USD/g grado industrial (Sigma-Aldrich, Toluca, México) (Mulder et al. 2015). Se han evaluado alternativas económicas para producir LOV; al respecto, la fermentación en estado sólido (FES) con hongos filamentosos es uno de los bioprocesos más promisorios. Una ventaja de este proceso aplicado a la nutrición animal radica en los sustratos (esquilmos agrícolas) de la FES, los cuales una vez fermentados pueden utilizarse como portadores de LOV y posteriormente incorporarse a las raciones para rumiantes como suplementos anti-metanogénicos (Jahromi et al. 2013, Morgavi et al.

2013, Ábrego-García et al. 2021a). El enfoque de los residuos agrícolas postfermentados como portadores de LOV puede reducir considerablemente los costos de insumos externos en los sistemas de producción pecuaria, especialmente los asociados a la LOV de grado industrial. Otra ventaja de este enfoque se relaciona con el ahorro del proceso de extracción y purificación ulterior de la LOV (Chen et al. 2014). Asimismo, desde el punto de vista ambiental, se evitan emisiones de solventes al ambiente (Clarke et al. 2018).

No obstante, debe considerarse que estos rastrojos fermentados portadores de LOV contienen además una gran diversidad de metabolitos secundarios sintetizados por los hongos durante la FES (Rustamova et al. 2020). Por lo tanto, se debe comprobar que el efecto antimetanogénico de los residuos agrícolas postfermentados corresponda de forma predominante a la LOV y no exprese sinergias con otros metabolitos de la FES (Ábrego-García et al. 2021b).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la LOV sobre la mitigación de metano y otras variables de fermentación ruminal in vitro de una dieta alta en grano, característica de un sistema de bovinos productores de carne. A su vez, se comparó el efecto de la LOV frente a inhibidores metanogénicos como la MON y el BES.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Se realizó una prueba de fermentación ruminal in vitro en lote. Se utilizó una dieta alta en grano, fluido ruminal de bovinos y tres compuestos antimetanogénicos. Se empleó un diseño completamente al azar con tres tratamientos (mg/L): LOV (300); MON (20); BES (6), y un (T). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las variables de respuesta (producción de gas total y CH<sub>4</sub>) se muestrearon a las 12, 24, 36 y 48 h. La concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) se muestreó a las 48 h.

### Hidrólisis y determinación de la estructura $\beta$ -hidroxiácido de la lovastatina

La LOV se adquirió en forma de lactona inactiva (LA) de Fermic (Ciudad de México). Se hidrolizó a su forma  $\beta$ -hidroxiácido activa (HI) en una solución de NaOH-EtOH (15 % [v/v] etanol; 0.25 % [p/v] NaOH); después se incubó a 55 °C por 1 h, se ajustó el pH a 7.2 con HCL 0.1 N (Lorenz y Parks 1990) y se filtró con acrodiscos de 0.45  $\mu$ m (Millipore, MA, EUA).

Posteriormente se determinó la concentración de LOV en forma HI por HPLC-UV (Varian Analytical Instruments, Modelo 9010, CA, EUA) de acuerdo con Yang y Hwang (2006). Se utilizó una columna Gemini 5U C18 (Phenomenex, CA, EUA) y como fase móvil acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) acidificada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0.1 % (flujo de 0.5 mL/min). La longitud de onda fue de 235 nm y el volumen de inyección de 50  $\mu$ L. El estándar LOV-LA se obtuvo de Sigma-Aldrich (Toluca, México). La forma LOV-HI se obtuvo de la hidrólisis de la LOV-LA (Lorenz y Parks 1990, Patil et al. 2015).

### Producción de gas in vitro

El experimento se realizó en el Laboratorio 33 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN (Ciudad de México) en julio de 2018. Se usaron frascos serológicos de 120 mL como digestores. Se les adicionaron 0.5 g de una dieta para bovinos (tamaño de partícula, 1 mm), la cual contenía respecto a materia seca: maíz molido, 56.6 %; soya, 12 %; urea, 1 %; mezcla mineral, 2 %; y rastrojo de avena, 28.4 %. Después se les añadieron 30 mL de una solución amortiguadora mineral (Menke et al. 1979), se ajustó el pH del medio a 6.8 y fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121 °C y 15 psi. Posteriormente se agregaron los siguientes tratamientos: T (sin inhibidor metanogénico); LOV, 300 mg/L (0.74 mmol/L); BES, 20 mg/L (0.105 mmol/L); y MON, 6 mg/L (0.0089 mmol/L). El BES y la MON (pureza 99.0 %<sup>+</sup>) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Toluca, México) y se diluyeron en agua destilada estéril. Todos los tratamientos se aplicaron en un volumen de 1 % (v/v) del medio de cultivo. Finalmente, las botellas fueron purgadas con CO<sub>2</sub> y conservadas a -4 °C.

El inóculo de fluido ruminal se obtuvo de tres novillos fistulados y canulados del rumen (Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México) bajo la norma de cuidado animal NOM-062-ZOO (SAGARPA 2001). Los novillos fueron alimentados con una dieta que contenía 40 % de concentrado y 60 % de forraje. El fluido ruminal se extrajo 2 h después de alimentar a los animales y se transportó inmediatamente al laboratorio en termos (2 L) precalentados a 39 °C.

Finalmente, se inocularon 15 mL del fluido ruminal filtrado con cuatro capas de manta de cielo en las botellas serológicas previamente cargadas con la dieta, solución amortiguadora mineral e inhibidores metanogénicos, las cuales fueron incubadas a 39 °C con agitación de 90 rpm por 48 h. Se usó un blanco por triplicado para ajustar la producción total de gas,

el cual contenía 30 mL de la solución amortiguadora mineral + 15 mL del fluido ruminal.

### Cuantificación de gas total y metano

Para estimar la producción de gas total, cada botella serológica fue conectada con manguera tygon a un medidor de gas por desplazamiento de salmuera (Muñoz-Páez et al. 2014). La producción de gas total del blanco fue usada para calcular el rendimiento de gas en cada tratamiento (producción de gas = acumulación de gas en cada tiempo de muestreo – promedio del blanco).

El volumen de gas se calculó con la ley de los gases ideales (Castellan 1987) a partir de los datos de presión y temperatura de las muestras. Los volúmenes de gas total y metano se normalizaron (SmL) a presión y temperatura de 101.32 kPa y 298 K, respectivamente (Ábrego-García et al. 2021a).

La producción de metano se cuantificó antes de medir la producción de gas total; se muestreó 1 mL del espacio gaseoso de cada digestor con una jeringa de muestras gaseosas y se inyectó en un cromatógrafo (Gow-Mac, Model 350, PA, EUA) equipado con un detector de conductividad térmica. Se utilizó una columna empacada de gel de sílice de 60/80 de diámetro. La temperatura del inyector, columna y detector fueron 37, 70 y 100 °C, respectivamente. Se usó argón como gas acarreador. El estándar de CH<sub>4</sub> y el Ar fueron de grado cromatográfico (> 99.9 %, INFRA, Ciudad de México).

### Determinación de ácidos grasos volátiles

Las muestras se prepararon de acuerdo a Cottyn y Boucque (1968). Brevemente, en un tubo Eppendorf (1.5 mL) se depositaron 250 µL de ácido metafosfórico (25 % p/v) y 750 µL del fluido de las botellas serológicas. Después, los tubos fueron centrifugados a 6000 × g durante 15 min. Se recuperaron 600 µL de sobrenadante en viales para cromatografía de 1 mL (Perkin Elmer, EUA). Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo Auto System (Perkin Elmer, EUA) equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar (ZB-FFAP, Phenomenex, EUA). La temperatura del detector fue de 250 °C y la del inyector de 230 °C. Se utilizó N<sub>2</sub> como gas acarreador a un flujo de 9 psi. La temperatura del horno se programó a 70 °C/2 min, con un incremento de 140 °C y una rampa de 5 °C/min. Posteriormente, la temperatura se mantuvo constante a 200 °C/6 min (Muñoz-Páez et al. 2014). Las concentraciones de AGV en las muestras se compararon con la curva de calibración de los estándares del ácido acético, propiónico y butírico (Sigma-Aldrich, Toluca, México).

### Análisis estadístico

Las variables de respuesta producción de gas total, metano y AGV fueron analizadas mediante análisis de varianza. Para ello se usó un diseño completamente al azar con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

donde  $Y_{ij}$  es la variable de respuesta en la  $j$ -ésima repetición (botella serológica) del  $i$ -ésimo tratamiento;  $\mu$  es la media general de todos los datos del experimento;  $T_i$  es el efecto del tratamiento  $i$ ; y  $\varepsilon_{ij}$  es el error experimental asociado al sujeto  $j$  bajo el tratamiento  $i$ .

Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS Studio v. 3.8 (SAS 2018). Las medias se compararon con la prueba de la mínima diferencia significativa (Steel et al. 1997).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

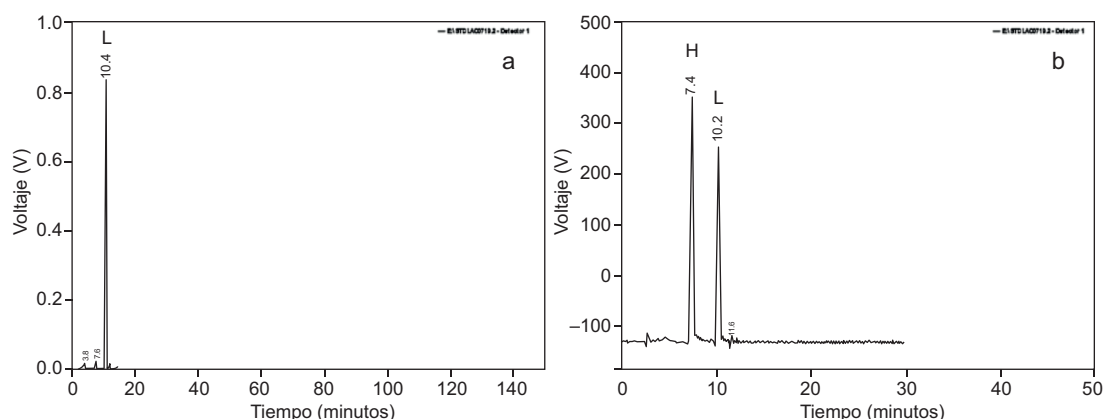
El análisis de cromatografía líquida (HPLC) permitió determinar que la LOV inicialmente contenía 96.0 % en forma de LA (**Fig. 1a**) y después de su hidrólisis alcalina (**Fig. 1b**) se generó un 58.8 % de forma HI. Con base en lo anterior, el tratamiento con LOV 300 mg/L equivaldría a 176.5 mg/L en forma HI. Así, este trabajo reporta por primera vez la hidrólisis y cuantificación de la forma  $\beta$ -hidroxiácido de LOV pura como tratamiento antimetanogénico in vitro. Los resultados anteriores son congruentes con los de Beltrán et al. (2019), quienes hidrolizaron LOV pura en NaOH (0.1 M), pH 12.5 a 37 °C, obteniendo una conversión a la forma HI de aproximadamente 50 % antes de las 12 h.

La **figura 2** muestra la producción de gas total con los tratamientos LOV, BES, MON y T a las 12, 24, 36 y 48 h de incubación. Al tiempo 12 h, los tratamientos LOV y CON tuvieron un comportamiento similar, pero a partir de las 24 h, el primero presentó una disminución sobre la producción de gas que mantuvo hasta el término del muestreo. Los tratamientos MON y BES presentaron una disminución sobre la producción de gas a partir de las 12 h, tendencia que se mantuvo hasta las 48 h de incubación.

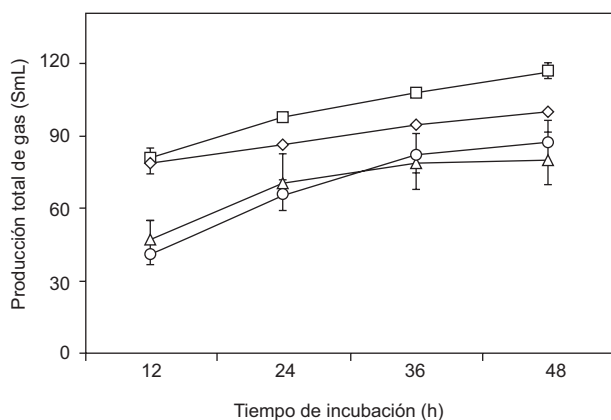
Como se observa en la **figura 3**, los tres tratamientos tuvieron efectos antimetanogénicos a partir de las 12 h de incubación. El BES y el MON alcanzaron la mayor inhibición de metano entre las 24 y 36 h de incubación mientras que el LOV la obtuvo a las 12 h.

Ésta es la primera vez que se reporta la cinética de producción de gas total y metano in vitro asociada

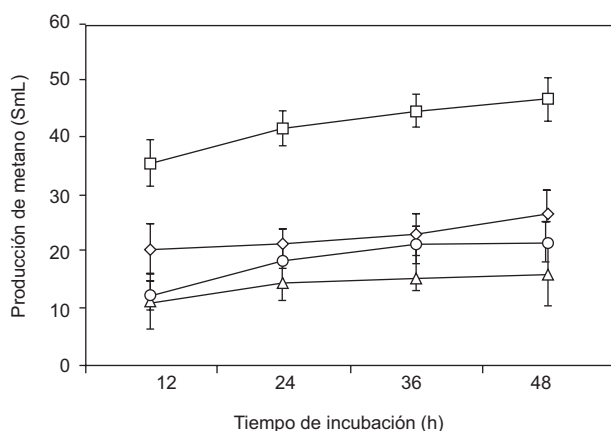




**Fig. 1.** Análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por su sigla en inglés) de la lovastatina (LOV) (a) sin hidrolizar y (b) hidrolizada. Los picos representan: L: LOV-LA (lactona inactiva); H: LOV-HI ( $\beta$ -hidroxiácido activa).



**Fig. 2.** Producción total de gas in vitro de una dieta alta en grano para bovinos de carne. □ testigo; Δ ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ○ monensina (6 mg/L); ◇ lovastatina (300 mg/L).



**Fig. 3.** Producción de metano ruminal in vitro de una dieta alta en grano para bovinos de carne. □ testigo; Δ ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ○ monensina (6 mg/L); ◇ lovastatina (300 mg/L).

al efecto antimetanogénico de la LOV pura. En este sentido, únicamente se había reportado la producción in vitro de gas total o metano acumulado al tiempo final de incubación (Busquet et al. 2005, Soliva et al. 2011, O'Brien et al. 2013).

Los variables de fermentación in vitro evaluadas al tiempo final de muestreo (48 h) se presentan en el **cuadro I**. La producción de gas total fue significativamente menor en todos los tratamientos con relación al testigo. La inhibición de metano con LOV y MON fue de 43.56 y 53.54 %, respectivamente ( $p < 0.05$ ). El BES demostró el mejor efecto antimetanogénico con aproximadamente 61.66 %.

Al respecto, Busquet et al. (2005) y O'Brien et al. (2013) evaluaron LOV pura con dosis de 5 y 3 mg/L. Ambos ensayos se realizaron con una dieta relación forraje a concentrado (f:c) de 50:50 y fluido ruminal de bovinos como inóculo. Los resultados de estos trabajos no mostraron efectos significativos sobre la mitigación de metano, lo cual probablemente se deba a que las dosis de LOV evaluadas (basadas en el trabajo pionero de Miller y Wollin [2001]) fueron muy bajas ( $< 5$  mg/L). Sin embargo, dicho trabajo se realizó con cepas puras de metanógenos en medio líquido, lo que sugiere inicialmente efectos de la concentración de sólidos (dieta experimental y fluido ruminal) en el medio de cultivo asociados a las dosis de LOV. Lo anterior coincide con el trabajo de Soliva et al. (2011), quienes reportaron una disminución de metano ruminal de ~40 % con una dosis de LOV 30 veces mayor a los trabajos anteriores (150 mg/L). Estos investigadores utilizaron la técnica de simulación de rumen (*rumen simulation technique*, RUSITEC), fluido ruminal de bovinos y una dieta con relación f:c de 50:50.

**CUADRO I.** EFECTO DE LA LOVASTATINA, LA MONENSINA SÓDICA Y EL ÁCIDO BROMOETANO SULFÓNICO SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO.

Variable	Tratamiento				EEM	Valor P
	T	LOV	MON	BES		
Gas total (SmL)	116.50a	99.57b	87.28bc	80.54c	7.1	0.0012
CH <sub>4</sub> (SmL)	47.53a	26.74b	21.91bc	18.03c	3.3	<.0001
J (%)	0.00	43.56a	53.54b	61.66b	4.8	0.0104
pH	6.1	6.2	6.1	5.9	0.2	0.5597
AGV (mM)	83.50a	78.00a	60.50c	92.01b	5.5	0.0006
AGV (mol/100 mol)						
Acetato	59.49a	60.66a	46.56b	57.2a	2.7	0.0007
Propionato	26.86a	28.37a	37.01b	27.50a	2.1	0.0009
Butirato	12.10a	10.60a	15.26b	14.83b	1.6	0.0223
A/P	2.27a	2.14a	1.32b	2.08a	0.3	0.0030

<sup>a,b,c</sup>Medias con distinta letra en una fila son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

T: testigo; LOV: lovastatina (300 mg/L); MON: monensina (6 mg/L); BES: ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); EEM: error estándar de la media; SmL: volumen de gas normalizado; J: inhibición de la metanogénesis respecto al testigo; AGV: ácidos grasos volátiles; A/P: relación acetato/propionato.

Otro factor importante en la mitigación de metano en fermentaciones ruminales in vitro con LOV se relaciona con la forma química de este inhibidor. Normalmente, la LOV se comercializa en su forma estable y no activa (LA), es decir, no tiene la estructura conformacional necesaria para ser el inhibidor competitivo de la enzima HMG-CoA reductasa (Hubert et al. 2018).

Existen algunas técnicas para hidrolizar la LOV a su forma activa (HI) (Klingelhöfer y Morlock 2019); sin embargo, los experimentos a corto plazo no reportan la estimación de la dosis antimetanogénica en su forma HI (Busquet et al. 2005, Soliva et al. 2011, O'Brien et al. 2013). Además de la hidrólisis química, la microbiota presente en el intestino de seres humanos puede catalizar la conversión de LOV-LA a su forma HI (Demonfort-Nkamga et al. 2017). Del mismo modo, este proceso puede ocurrir en agua después de dos días de incubación a pH 7 y 37 °C (Beltrán et al. 2019). Lo anterior puede ser clave para establecer los efectos de la LOV sobre fermentaciones in vitro a corto plazo.

De esta manera, los resultados satisfactorios de Soliva et al. (2011) obtenidos en experimentos de inhibición de la metanogénesis ruminal con LOV pudieran estar influidos por la hidrólisis de este compuesto, dado que su incubación fue a largo plazo (10 días), lo cual es congruente con la hidrólisis microbiana o química descrita anteriormente.

Los resultados de los tratamientos MON y BES en el presente estudio se comparan favorablemente con investigaciones previas. Primero, Capelari y Powers

(2017) evaluaron el efecto de la MON (6 mg/L) sobre la fermentación in vitro, una dieta con relación f:c de 10:90 y fluido ruminal de bovinos. Los resultados demostraron que la producción de gas disminuyó a las 24 y 48 h de muestreo mientras que la producción de metano disminuyó significativamente en todos los tiempos de muestreo (4, 8, 12, 24 y 48 h). Asimismo, Lee et al. (2009) evaluaron el efecto del BES (10.5 mg/L) sobre la fermentación in vitro de una dieta con relación f:c de 60:40 y fluido ruminal de bovinos, lo cual disminuyó significativamente la producción de gas. Resulta interesante destacar que la mitigación de metano asociado al BES fue mayor a 95 % en todos los tiempos de muestreo (24, 48 y 72 h).

El 3-nitrooxipropanol es un compuesto relativamente nuevo que ha tenido buena aceptación en materia de mitigación de metano ruminal (Jayanegara et al. 2018, Zhang et al. 2018). Se ha reportado que este compuesto a dosis de 200 y 160 mg/kg (materia seca) inhibió en 78 y 40 % la producción de metano ruminal de dietas altas en grano usando el sistema RUSITEC (Romero-Pérez et al. 2017, Schilde et al. 2021). Esto sugiere que la LOV puede mantener un nivel cercano a inhibidores de la metanogénesis introducidos más recientemente, como es el caso del 3-nitrooxipropanol.

La producción de AGV del tratamiento LOV no mostró diferencias significativas en comparación con el testigo (**Cuadro I**), de manera similar a las proporciones molares de acetato, propionato y butirato. Estos resultados coinciden con los reportados por Soliva et al. (2011), quienes demostraron que cuando la LOV

inhibió ( $p < 0.05$ ) la producción de metano in vitro, la concentración total de AGV disminuyó ligeramente y no se afectaron las proporciones de acetato y butirato, aunque se observó una disminución de propionato.

Generalmente la mitigación de metano ruminal está asociada con el aumento de propionato como una ruta aceptora de electrones durante la fermentación ruminal. A pesar de ello, existen rutas alternas, e.g., fumarato a succinato, piruvato a lactato, síntesis de biomasa y biohidrogenación (Ungerfeld 2020). Estas rutas alternas podrían utilizarse cuando la LOV inhibe la metanogénesis ruminal, dado que en el presente trabajo no se observaron cambios en la concentración total ni el perfil de AGV.

Una ventaja de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (LOV y simvastatina) como aditivo antimetanogénico a nivel ruminal es su especificidad sobre arqueas metanogénicas (Gottlieb et al. 2016). Se ha comprobado que la LOV no afecta en cultivo puro algunas de las bacterias (*R. albus*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvens*, *F. succinogenes* y *S. ruminantium*) celulolíticas y fibrinolíticas del rumen (Miller y Wollin 2001).

En el caso del tratamiento con MON, el total de AGV y la concentración de acetato disminuyeron ( $p < 0.05$ ), pero aumentó la proporción tanto de propionato como de butirato, de manera que la relación acetato/propionato disminuyó ( $p < 0.05$ ). Los efectos de la MON sobre la fermentación ruminal han sido evaluados más ampliamente (Appuhamy et al. 2013). Normalmente, la MON afecta a las bacterias productoras de hidrógeno (Russell 1987), ya que este metabolito es el principal sustrato para la metanogénesis ruminal. Además, la MON está relacionada con cambios establecidos sobre el perfil metabólico a nivel ruminal, entre los cuales destaca un aumento de propionato (Bagheri et al. 2018); no obstante, se ha indicado que en dietas altas en almidón, determinados microorganismos (e.g., *P. bryantii*) implicados en la generación de  $H_2$  no son sensibles a la MON (Weimer et al. 2008). Además, este ionóforo puede afectar a las bacterias *M. elsdenii* y *B. fibrisolvens*, involucradas en la biohidrogenación de lípidos (Weimer et al. 2008).

El tratamiento con BES produjo una disminución significativa del total de AGV y solamente promovió un aumento significativo de la concentración de butirato (**Cuadro I**). Resultados similares fueron reportados por Lee et al. (2009), quienes en experimentos de fermentación in vitro con BES (10.5 mg/L) indicaron que este compuesto no tiene efecto sobre el total de AGV, pero disminuye la proporción molar del acetato, presenta ligeros cambios sobre el propionato y aumenta la proporción de butirato ( $p < 0.05$ ).

En contraste con los compuestos antimetanogénicos, una estrategia sostenible para mitigar los GEI es la adaptación de la ganadería a sistemas silvopastoriles (Murgueitio et al. 2014). En este sentido, Jiménez-Santiago et al. (2019) evaluaron la fermentación ruminal in vitro de forrajes de un sistema silvopastoril en Chiapas, México. Reportaron que el volumen de gas producido de *L. leucocephala* fue significativamente menor con relación a otros forrajes (e.g., *P. maximum* y *G. sepium*). Asimismo, cuando se mezclaron *G. sepium* y *L. leucocephala* con el pasto *P. maximum* y recursos locales para alimentación de ganado (maíz, melaza y banano) la reducción de metano in vitro fue significativa. Desde esta perspectiva, resultaría interesante evaluar los efectos de la LOV sobre la fermentación ruminal de forrajes disponibles en sistemas silvopastoriles.

## CONCLUSIÓN

La LOV mostró efectos alentadores para la mitigación de metano (43.56 %) en la fermentación in vitro de una dieta alta en grano, característica de un sistema de bovinos productores de carne, sin afectar la producción total ni el perfil de AGV. No obstante, la dosis para obtener este resultado fue muy alta en comparación con las de otros tratamientos. En cuanto al BES y la MON, esta última fue la más efectiva (53.54 %) considerando la relación concentración/inhibición de metano ruminal. El BES tuvo la inhibición más alta de metano (61.66 %) sin muchos cambios en los metabolitos de fermentación.

Debido a la forma común de la LOV-LA inactiva, se sugieren experimentos futuros para establecer la función de la microbiota ruminal en la conversión de LOV-LA a su forma  $\beta$ -hidroxiácido, de su biodegradación y estabilidad en cultivos anaerobios ruminales a largo plazo.

## Notación

AGV	ácidos grasos volátiles
BES	ácido bromoetano sulfónico
FES	fermentación en estado sólido
f:c	forraje:concentrado
GEI	gases de efecto invernadero
HI	$\beta$ -hidroxiácido
HMG-CoA	hidroximetilglutaril-CoA
LA	lactona
LOV	lovastatina
MON	monensina

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la SEP-CONACYT por el financiamiento del proyecto “Estudios sobre mitigación de producción de metano ruminal de bovinos utilizando lovastatina” (CB 2018-1, No. A1-S-26901). El primer autor agradece al CONACYT por una beca doctoral (337183). Asimismo, agradecemos al I.Q.I. Gustavo G. Medina Mendoza (Central Analítica, DBB-CINVESTAV) por su excelente asistencia técnica con análisis cromatográficos varios.

## REFERENCIAS

- Ábrego-García A., Poggi-Varaldo H.M., Mendoza-Vargas A., Mercado-Valle F.G., Ríos-Leal E., Ponce-Noyola T. y Calva-Calva G. (2021a). Effects of fermented oat straw as a lovastatin-carrier on in vitro methane production and rumen microbiota. *Frontiers in Energy Research* 9, 630701. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.630701>
- Ábrego-García A., Poggi-Varaldo H.M., Robles-González V., Ponce-Noyola T., Calva-Calva G., Ríos-Leal E., Estrada-Bárceñas D. y Mendoza-Vargas A. (2021b). Lovastatin as a supplement to mitigate rumen methanogenesis: an overview. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12, 123. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00641-8>
- Appuhamy J.A., Strathe A.B., Jayasundara S., Wagner-Riddle C., Dijkstra J., France J. y Kebreab E. (2013). Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 96 (8), 5161-5173. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5923>
- Bagheri V.M., Klevenhusen F., Zebeli Q. y Petri R. (2018). *Scrophularia striata* extract supports rumen fermentation and improves microbial diversity in vitro compared to Monensin. *Frontiers in Microbiology* 9, 2164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02164>
- Beltrán D., Frutos-Lisón M.D., Espín J. C. y García-Villalba R. (2019). Re-examining the role of the gut microbiota in the conversion of the lipid-lowering statin monacolin K (lovastatin) into its active  $\beta$ -hydroxy acid metabolite. *Food and Function* 10, 1787-1791. <https://doi.org/10.1039/C8FO02594K>
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Carro M.D. y Kamel C. (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 88 (7), 4393-4404. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73126-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73126-X)
- Capelari M. y Powers W. (2017). The effect of nitrate and monensin on in vitro ruminal fermentation. *Journal of Animal Science* 95 (11), 5112-5123. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1657>
- Castellan G. (1987). *Físicoquímica*. 2a ed. Pearson, Massachusetts, EUA, 1088 pp.
- Chen L., Sharifzadeh M., Mac Dowell N., Welton T., Shah N. y Hallett J. P. (2014). Inexpensive ionic liquids: [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>-based solvent production at bulk scale. *Green Chemistry* 16 (6), 3098-3106. <https://doi.org/10.1039/c4gc00016a>
- Clarke C.J., Tu W.C., Levers O., Bröhl A. y Hallett J.P. (2018). Green and sustainable solvents in chemical processes. *Chemical Reviews* 118 (2), 747-800. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00571>
- Cottyn B.G. y Boucque C.V. (1968). Rapid method for the determination of steam-volatile fatty acids in rumen liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16 (1), 105-107. <https://doi.org/10.1021/jf60155a002>
- Demonfort-Nkamga V., Armstrong N. y Drancourt M. (2017). In vitro susceptibility of cultured human methanogens to lovastatin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49 (2), 176-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.026>
- Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A. y Tempio G. (2013). Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Italia, 189 pp.
- Gottlieb K., Wachter V., Sliman J. y Pimentel M. (2016). Review article: Inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 43 (2), 197-212. <https://doi.org/10.1111/apt.13469>
- Grossi G., Goglio P., Vitali A. y Williams A. G. (2019). Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers* 9 (1), 69-76. <https://doi.org/10.1093/af/vfy034>
- Hubert S., Chadwick A., Wachter V., Coughlin O., Kokai-Kun J. y Bristol A. (2018). Development of a modified-release formulation of lovastatin targeted to intestinal methanogens implicated in irritable bowel syndrome with constipation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107 (2), 662-671. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.09.028>
- INECC (2018). *Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero 2018*. Base de datos México. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático [en línea]. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero-inegycei-07/01/2021>
- Jahromi M.F., Liang J.B., Mohamad R., Goh Y.M., Shokryazdan P. y Ho Y.W. (2013). Lovastatin-enriched rice



- straw enhances biomass quality and suppresses ruminal methanogenesis. *BioMed Research International* 2013, 397934. <https://doi.org/10.1155/2013/397934>
- Jayanegara A., Ageng S.K., Kondo M., Matsui H., Ridla M., Laconi E.B. y Ramli N. (2018). Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants: A meta-analysis. *Italian Journal of Animal Science* 17 (3), 650-656. <https://doi.org/10.1080/1828051x.2017.1404945>
- Jiménez-Santiago Á., Jiménez-Ferrer G., Alayón-Gamboa A., Pérez-Luna, E.J., Piñeiro-Vázquez, Á.T., Albores-Moreno S., Pérez-Escobar M.G. y Castro-Chan R. (2019). Fermentación ruminal y producción de metano usando la técnica de gas in vitro en forrajes de un sistema silvopastoril de ovinos de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10 (2), 298-314. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4529>
- Klingelhöfer I. y Morlock G.E. (2019). Lovastatin in lactone and hydroxy acid forms and citrinin in red yeast rice powders analyzed by HPTLC-UV/FLD. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411 (25), 6655-6665. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02039-y>
- Lee S.Y., Yang S.H., Lee W.S., Kim H.S., Shin D.E. y Ha J.K. (2009). Effect of 2-bromoethanesulfonic acid on in vitro fermentation characteristics and methanogen population. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22 (1), 42-48. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80581>
- Liu H., Wang J., Wang A. y Chen J. (2011). Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5), 1333-1340. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3066-5>
- Lorenz R.T. y Parks L.W. (1990). Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (9), 1660-1665. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.9.1660>
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D y Scheneider W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science* 93, 217-222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>
- Miller T.L. y Wollin M.J. (2001). Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-SCoA reductase inhibitors. *Journal of Dairy Science* 84 (6), 1445-1448. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70177-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70177-4)
- Morgavi D.P., Martin C. y Boudra H. (2013). Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production in vitro and in vivo. *Journal of Animal Science* 91 (2), 848-860. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5665>
- Mulder K.C., Mulinari F., Franco O.L., Soares M.S., Magalhães B.S. y Parachin N.S. (2015). Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnology Advances* 33 (6), 648-65. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.001>
- Muñoz-Páez K.M., Poggi-Varaldo H.M., García-Mena J., Ponce-Noyola M.T., Ramos-Valdivia A.C., Barrera-Cortés J., Robles-González I.V., Ruiz-Ordaz N., Villatanaca N. y Rinderknecht-Seijas N. (2014). Cheese whey as substrate of batch hydrogen production: Effect of temperature and addition of buffer. *Waste Management and Research* 32 (5), 434-440. <https://doi.org/10.1177/0734242X14527333>
- Murgueitio R.E., Chará O.J., Barahona R.R., Cuartas C.C. y Naranjo R.J. (2014). Los sistemas silvopastoriles intensivos (SSPI), herramienta de mitigación y adaptación al cambio climático. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17 (3), 501-507.
- O'Brien M., Navarro-Villa A., Purcell P.J., Boland T. y O'Kiely P. (2013). Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. *Animal Production Science* 54 (2), 141-157. <https://doi.org/10.1071/AN12204>
- Patil R. H., Patil M. P. y Maheshwari V. L. (2015). Rapid chromatographic determination and structural confirmation of  $\beta$ -hydroxy acid form of lovastatin in the fermentation broth of *Aspergillus terreus* PM03. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 49 (6), 419-424. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1298-5>
- Patra A., Park T., Kim M. y Yu Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8 (1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Romero-Pérez A., Okine E.K., Guan L.L., Duval S.M., Kindermann M. y Beauchemin K.A. (2017). Rapid communication: Evaluation of methane inhibitor 3-nitrooxypropanol and monensin in a high-grain diet using the rumen simulation technique (Rusitec). *Journal of Animal Science* 95 (9), 4072-4077. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1896>
- Russell J.B. (1987). A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. *Journal of Animal Science* 64 (5), 1519-1525. <https://doi.org/10.2527/jas1987.6451519x>
- Rustamova N., Bozorov K., Efferth T. y Yili A. (2020). Novel secondary metabolites from endophytic fungi: Synthesis and biological properties. *Phytochemistry Reviews* 19, 425-448. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09672-x>

- SAGARPA (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación, México. 22 de agosto de 2001.
- SAS Institute Inc. (2018). SAS® Studio 3.8: Administrator's guide. Cary, NC, EUA, 66 pp.
- Saunio M., Stavert A.R., Poulter B., Bousquet P., Canadell J.G., Jackson R.B., Raymond P.A., Dlugokencky E.J., Houweling S., Patra P.K., Ciais P., Arora V.K., Bastviken D., Bergamaschi P., Blake D.R., Brailsford Gordon, Bruhwiler L., Carlson K.M., Carrol M., Castaldi S., Chandra N., Crevoisier C., Crill P.M., Covey K., Curry C.L., Etiope G., Frankenberg C., Gedney N., Hegglin M.I., Höglund-Isaksson L., Hugelius G., Ishizawa M., Ito A., Janssens-Maenhout G., Jensen K.M., Joos F., Kleinen T., Krummel P.B., Langenfelds R.L., Laruelle G.G., Liu L., Machida T., Maksyutov S., McDonald K.C., McNorton J., Miller P.A., Melton J.R., Morino I., Müller J., Murguía-Flores F., Naik V., Niwa Y., Noce S., O'Doherty S., Parker R.J., Peng C., Peng S., Peters G.P., Prigent C., Prinn R., Ramonet M., Regnier P., Riley W.J., Rosentreter J.A., Segers A., Simpson I.J., Shi H., Smith S.J., Steele L.P., Thornton B.F., Tian H., Tohjima Y., Tubiello N.F., Tsuruta A., Viovy N., Voulgarakis A., Weber T.S., Weele M.V., van der Werf G., Weiss R.F., Worthy D., Wunch D., Yin Y., Yoshida Y., Zhang W., Zhang Z., Zhao Y., Zheng B., Zhu Q., Zhu Q. y Zhuang Q. (2020). The global methane budget 2000-2017. *Earth System Science Data* 12, 1561-1623. <https://doi.org/10.5194/essd-12-1561-2020>
- Schilde M., von Soosten D., Hüther L., Kersten S., Meyer, U., Zeyner A. y Dänicke S. (2021). Dose-response effects of 3-nitrooxypropanol combined with low- and high-concentrate feed proportions in the dairy cow ration on fermentation parameters in a rumen simulation technique. *Animals* 11, 1784. <https://doi.org/10.3390/ani11061784>
- Soliva C.R., Amelchanka S.L., Duval S.M. y Kreuzer M. (2011). Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* 106 (01), 114-122. <https://doi.org/10.1017/S0007114510005684>
- Steel R.G.D., Torrie, J.H. y Dicky D.A. (1997). Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. 3a ed. McGraw Hill, Nueva York, EUA, 666 pp.
- Ungerfeld E.M. (2020). Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: Principles and possibilities of interventions. *Frontiers in Microbiology* 11, 589. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- Ungerfeld E.M., Rust S.R., Boone D.R. y Liu Y. (2004). Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *Journal of Applied Microbiology* 97 (3), 520-526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02330.x>
- Weimer P.J., Stevenson D.M., Mertens D.R. y Thomas E.E. (2008). Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (1), 135-145. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1528-9>
- Wong A. 2019. Unknown risk on the farm: Does agricultural use of ionophores contribute to the burden of antimicrobial resistance? *mSphere* 4 (5), e00433-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00433-19>
- Yang D.J. y Hwang L.S. (2006). Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *Journal of Chromatography A* 1119 (1-2), 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.031>
- Zhang Z.W., Cao Z.J., Wang Y.L., Wang Y.J., Yang H.J. y Li S.L. (2018). Zwitteric compounds as potential methanogenic inhibitors in ruminant animals: A review. *Animal Feed Science and Technology* 236, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.010>