https://doi.org/10.22319/rmcp.v16i2.6629

Artículo

Potencial de un fitobiótico a base de *Acacia concinna* y el alga roja *Palmaria palmata* para reducir la producción ruminal de metano *in vitro*

Oscar Ponce-Pérez [a]

German David Mendoza-Martínez [a,b]

Pedro Abel Hernández-García [c]

Adrián Gloria-Trujillo [a,b]

María Eugenia de la Torre-Hernández [a,d]*

Héctor Aaron Lee-Rangel [e]

Rogelio Flores-Ramírez [e]

José Alejandro Roque-Jiménez [f]

[a] Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. División de Ciencias Biológicas. Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Ciudad de México, México.

[b] Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. México.

[c] Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Amecameca. México.

[d] Secihti - Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. México.

[e] Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía. México.

[f] Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ciencias Agrícolas. México.

*Autor de correspondencia: mdelatorre@correo.xoc.uam.mx

Resumen:

Los cambios en la producción de metano y dióxido de carbono y sus efectos sobre la microbiota ruminal se evaluaron *in vitro* mediante la incubación de alfalfa con un aditivo herbal formulado con *Acacia concinna* y con un suplemento que contenía el alga roja *Palmaria palmata*. Se caracterizaron los metabolitos del suplemento con *Palmaria palmata* y se encontraron 20 compuestos químicos, entre los que se destacaron fenoles, terpenos, compuestos halogenados y alcanos. La inclusión del aditivo herbal redujo ($P<0.01$) el metano ruminal en un 29 % y el alga roja en un 56 %. La concentración molar de ácidos grasos volátiles (AGV) aumentó ($P<0.05$) con el aditivo de algas marinas. Los dos aditivos aumentaron las proporciones de acetato y propionato y redujeron la de butirato ($P<0.05$) en comparación con el control. No se detectaron diferencias ($P>0.05$) en la abundancia de la mayoría de las familias microbianas, solo cambios menores en *Rikenellaceae*; únicamente *Cellulomonadaceae* aumentó significativamente ($P>0.001$) con el aditivo herbal. Los dos aditivos mostraron un potencial reductor de metano, que fue más pronunciado para *Palmaria palmata*.

Palabras clave: Producción de gas, Metanogénesis, Aditivo natural, AGV.

Recibido: 29/01/2024

Aceptado: 07/05/2025

Introducción

En el contexto de un clima cambiante, es crucial reducir las emisiones ruminales de metano, además de que la emisión de metano representa una pérdida de energía para los rumiantes[(1)]. Entre los compuestos naturales que pueden reducir el metano se encuentran las saponinas de las plantas[(2)], disponibles en algunas mezclas poliherbales[(3)], y los compuestos halogenados sintetizados por algunas especies de algas[(4,5)].

Un aditivo herbal previamente descrito a base de *Acacia concinna* tiene un contenido estandarizado de saponinas y muestra efectos biológicos similares a los de los coccidiostáticos en pollos de engorda[(3)]. Afecta el rendimiento productivo de los corderos de engorda en corral[(6)] y de los terneros lecheros[(7)] y también contiene otros metabolitos secundarios, destacándose 43 compuestos orgánicos como timol, canela, cariofileno, fenoles, ácido oleico, ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E[(7)].

Las saponinas tienen efectos tóxicos sobre los protozoos, pero también forman complejos con la membrana lipídica de las bacterias, afectando a algunas poblaciones bacterianas[2]. La inclusión de saponinas en bajas concentraciones dietéticas puede ser beneficiosa para los rumiantes, mejorando la eficiencia de la fermentación ruminal al disminuir la metanogénesis, que está asociada a los efectos de las saponinas sobre las arqueas y protozoos ruminales[8-11].

Algunas especies del género de macroalgas rojas *Asparagopsis* producen metabolitos con efectos antimetanogénicos[12-16], y hay pruebas de que *Asparagopsis taxiformis* puede reducir significativamente las emisiones de metano en ovinos[17] y bovinos de carne[18,19]. Sin embargo, otras especies de algas deben evaluarse en términos de su potencial de reducción de metano en función de sus características bioquímicas[20,21]. Al comparar diferentes especies de algas marinas en ensayos ruminales *in vitro*, *Palmaria palmata* mostró mayor digestibilidad y producción de gases, así como mayores concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) y propionato que otras especies y produjeron concentraciones ruminales de metano más bajas[22]. *Palmaria palmata* es un alga roja (Rhodophyta) antiguamente llamada *Rhodymenia palmata* (Linneo) y pertenece a la familia *Palmariaceae*[23]. Se ha sometido a diferentes formas de cultivo[24] y se comercializa como suplemento para el consumo humano, por lo que está disponible como aditivo alimentario para rumiantes. En este contexto, el objetivo de este estudio fue comparar el potencial de reducción de metano *in vitro* de un aditivo vegetal alimentario hecho de *Acacia concinna* frente a un producto hecho de *Palmaria palmata*, evaluando los cambios en la producción de metano, la fermentación ruminal y los efectos sobre la microbiota ruminal.

Material y métodos

Animales e inóculo

El inóculo ruminal fue recolectado por un veterinario entrenado de corderos cruzados con una sonda esofágica en condiciones preprandiales con el objetivo de reducir la variación[25]. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la UAEM, Centro Universitario Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México (Protocolo #0201-2023). Los donantes de líquido ruminal fueron alimentados con 75 % de ensilado de maíz y 25 % de concentrado comercial con 12 % de proteína cruda. Este fluido utilizado como inóculo se colocó en un termo a 39 °C y se transportó al laboratorio de nutrición, donde se filtró a través de cuatro capas de estopilla y se saturó con dióxido de carbono.

Aditivos evaluados

Se analizaron dos productos comerciales: el producto herbario formulado con *Acacia concinna* (Peptasan®, Indian Herbs Specialties Pvt y Nuproxa México) y las cápsulas de algas rojas (Solaray Inc; Salt Lake City, UT) elaboradas con *Palmaria palmata*, que se puede obtener vía internet como suplemento para el consumo humano.

Caracterización del producto

Se utilizaron muestras del alga roja *Palmaria palmata* para caracterizar los metabolitos secundarios utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). La extracción se realizó mediante un procesador ultrasónico (GEX130, 115 V 50/60 Hz) equipado con una punta de titanio de 3 mm y agitadores mecánicos (Cole-Parmer, IL, EE. UU.) según lo descrito por Roque-Jiménez *et al*[26]. Un gramo del producto de algas rojas se mezcló con 10 ml de hexano para separar la fase orgánica mediante un procesador ultrasónico con una amplitud del 70 % y se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 min, seguido de una concentración en un baño de agua con una sonda directa de CO_2 durante 5 min a 37 °C para recuperar 1 ml de la mezcla extraída (Zymark, Evaporador de Concentración LV Turbovap, NB, EE. UU.). Los metabolitos se caracterizaron mediante un cromatógrafo de gases (GC-HP 6890) acoplado a un espectrofotómetro de masas (MSHP 5973), utilizando una columna capilar (60 m de longitud, 0.255 mm de diámetro, 0.25 µm de grosor) (HP 5MS, Agilent) en las condiciones descritas por Roque-Jiménez *et al*[26]. El producto herbal fue caracterizado previamente por Lee *et al*[7] y el contenido de saponinas fue reportado por Sánchez-Hernández *et al*[3].

Producción de gas *in vitro* y fermentación ruminal

La alfalfa se incubó como sustrato principal con 0 % y 2 % de alga roja o aditivo herbal, utilizando cinco matraces ámbar de 120 ml para cada tratamiento y sus controles; se realizaron dos corridas. Cada matraz contenía 0.5 g de alfalfa molida a un tamaño de partícula de 2 mm y 90 ml de líquido ruminal (añadido a cada matraz con un flujo continuo de CO_2) y fueron sellados. Se incluyeron cinco matraces como blanco que contenían solo inóculo ruminal. Los matraces se colocaron en un baño de agua a 39 °C y se registró la presión del gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h de incubación mediante un manómetro manual (Amphenol SSI Technologies)[27]. Para estimar el CH_4 y el CO_2 se utilizó la metodología propuesta por Menke y Steingass[28], registrando el volumen de gas acumulado hasta las 48 h con una jeringa hipodérmica graduada de 60 ml. En cada medición, el gas atrapado en la jeringa se transfirió por inyección a otro matraz herméticamente cerrado que contenía 40 ml de una solución de hidróxido de sodio (KOH 1M) preparada con agua destilada, mezclando el gas

para fijar el dióxido de carbono y formar bicarbonato de potasio[29,30]. El volumen residual se utilizó para estimar el metano[31].

Los matraces se filtraron en el momento final de incubación para estimar el porcentaje de desaparición de materia seca. Una submuestra de líquido ruminal a las 24 h de incubación se acidificó con ácido metafosfórico y se congeló hasta el análisis de AGV por cromatografía de gases[32], utilizando un Perkin Elmer Clarus 580 con una columna capilar de 30 m x 0.25 mm x 25 µm (modelo HP-FFAP de Agilent Technologies) y nitrógeno como gas portador.

Aislamiento de ADN y análisis metagenómicos

El líquido ruminal de seis tubos a las 12 h de fermentación se criopreservó y se almacenó inmediatamente a -80 °C hasta la extracción del ADN; se mezclaron 2 ml de cada muestra con 6 mL de Escudo de ADN/ARN (Zymo Research, Cat. No.: R1100-250; Lote. No.: 219429) y se envió a Zymo Research (Irvine, CA) para la extracción, cuantificación, secuenciación y análisis de ADN metagenómico por el servicio de secuenciación dirigida para el microbioma, según lo descrito por Mendoza-Martínez *et al*[33].

La secuenciación del gen microbiano ARNr 16S se realizó utilizando el kit de preparación de la biblioteca NGS Quick-16S™ (Zymo Research, Irvine, CA). La región V3-V4 de este gen se amplificó con iniciadores específicos diseñados a medida por Zymo Research. La biblioteca agrupada final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA) y posteriormente se cuantificó con TapeStation™ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA). Como control positivo para cada preparación de biblioteca dirigida, se empleó el estándar de ADN de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS™ (Zymo Research, Irvine, CA). Se incluyeron controles negativos (es decir, blanco de control de extracción y blanco de control de preparación de biblioteca) para evaluar el nivel de carga biológica inherente al proceso de extracción. La biblioteca final se secuenció en la plataforma Illumina MiSeq™ con un kit de reactivos v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con un pico de PhiX del 10 %. Se dedujeron variantes únicas de secuencias de amplicón a partir de lecturas sin procesar, utilizando el pipeline DADA2[34], que también sirvió para eliminar secuencias quiméricas. La asignación de la taxonomía se llevó a cabo utilizando Uclust de Qiime v. 1.9.1[35] con la base de datos propia de Zymo. La composición y los análisis de diversidad alfa y beta también se realizaron con Qiime v. 1.9.1.

Análisis estadístico

La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilk y los resultados se analizaron en un diseño de bloques completamente al azar[36] utilizando las corridas como criterio de bloqueo con el siguiente modelo:

$Y_i = \mu + B_i + T_j + B_i * T_j + e_{ij}$

Donde:

Y es la variable dependiente,

$\boldsymbol{\mu}$ es la población total de la media,

$\mathbf{B_i}$ es el efecto de fijación de las corridas (Bloque),

$\mathbf{T_i}$ es el efecto fijo del tratamiento,

$\mathbf{e_{ij}}$ es el error residual, utilizando las interacciones Bloque x tratamiento como error experimental[37].

Cuando se detectaron efectos significativos y se compararon las medias mediante contrastes ortogonales. Los parámetros cinéticos de producción de gas *in vitro* [fase de retardo (h), volumen máximo (Vm) y tasa de producción de gas (S)] se estimaron con el modelo Vo= Vm / (1 + e (2-4 * s * (tL))), propuesto por Menke y Steingass[28] y los parámetros se estimaron por regresión no lineal[38]. El software utilizado fue SAS® OnDemand for Academics (https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html).

Resultados

Caracterización del producto

La cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas reveló 20 compuestos químicos presentes en *Palmaria palmata* (Cuadro 1), incluyendo una variedad de fenoles, terpenos y alcanos como el heptadecano, seguido de tricaprilato de glicerol, que es un triglicérido de ésteres de ácido octanoico y otros componentes como el ácido 1,2-bencenodicarboxílico y el éster de dioctílico.

Cuadro 1: Identificación de compuestos volátiles en el suplemento de alga roja *Palmaria palmata* mediante cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas

Tiempo de retención (m)	Área Pct	Compuesto	Grupo
22.49	41.6478	Heptadecano	Alcano
40.64	13.556	Tricaprilato de glicerol	Triglicérido de ésteres de ácido octanoico
35.74	9.7744	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster dioctílico	Derivado dicarboxílico del benceno
20.22	6.1088	2(4H)-benzofuranona, 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-, (R)-	Terpeno
39.75	3.5267	Silano, 1,4-bis(trimetilsilil)benceno	Compuesto de sílice aromático
24.5	3.4513	2-pentadecanona, 6,10,14-trimetil-	Sesquiterpeno
28.48	3.1178	Fitol	Alcohol diterpénico natural acíclico, constituyente de la clorofila
28.51	2.6536	Fitol	
18.01	2.4876	Benceno metanol, alfa,4-dimetil-, (+/-.)-	IND
24.41	1.8725	Biciclo (3.1.1) heptano, 2,6,6-trimetil-, (1R-(1-alfa,2-beta,5-alfa))-	Terpenoide
39.98	1.655	1H-pirrol-2,5-diona, 1-(4-clorofenil)-	
36.61	1.5279	2(3H)-furanona, dihidro-5-tetradecilo-	Furano
19.75	1.4862	Fosfina, (1,1-dimetiletil) metilfenil-	IND
40.73	1.2167	2-etilacridina	IND
19.07	1.2149	Fenol, 2,4-bis(1-metilpropil)-	Fenol
19.14	1.0861	3-buten-2-ona, 4-(2,2,6-trimetil-7-oxabiciclo (4,1,0) hept-1-il)-	IND
25	1.0368	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	IND
25.58	0.9026	Ácido pentadecanoico, 14-metil-, éster metílico	Ácido graso
39.95	0.855	1,3-bis(trimetisilil)benceno	IND
40.01	0.8225	2,4-ciclohexadien-1-ona, 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxi-	Compuesto cetónico

IND= Información no disponible.

Producción de gas *in vitro* y fermentación ruminal

La producción de gas *in vitro* (Cuadro 2) se redujo con la adición del producto herbal y el alga roja en un 2 % y 7 %, respectivamente, en comparación con la del grupo testigo. La tasa de producción de gas fue más lenta con el alga roja (P<0.01), mientras que la fase de retardo y la digestibilidad de la materia seca (MS) *in vitro* no se vieron afectadas. El metano se redujo (P<0.01) con el aditivo herbal en un 29 % y en un 56 % con el alga roja en comparación con el de los controles; sin embargo, el nivel de CO_2 no se vio afectado. La concentración molar de AGV aumentó (P<0.05) con el aditivo de alga roja, el cual mostró mayor proporción de acetato y menores niveles de propionato y butirato (P<0.01) en comparación con los del grupo testigo. El producto herbal da como resultado un aumento de las proporciones de acetato y una reducción de los niveles de propionato (P<0.05).

Cuadro 2: Efectos de un fitobiótico a base de *Acacia concinna* y un suplemento comercial que contiene el alga roja *Palmaria palmata* sobre la cinética de producción de gas *in vitro*, fermentación ruminal y metano

	Testigo	**Alga roja**	**Aditivo herbal[x]**		**Contraste valor *P***	
		Palmaria palmata	***Acacia concinna***	**EEM**	**Testigo *vs* alga**	**Testigo *vs* aditivo herbal[x]**
V max, ml/g	168.16	156.76	165.03	2.360	0.014	0.048
S, %/h	0.039	0.031	0.037	0.002	0.018	0.044
Retardo, h	1.94	0.63	1.57	0.588	0.164	0.301
DIVMS %	69.60	69.42	68.57	0.951	0.896	0.553
AGV totales mmol/L	84.63	87.57	86.22	0.761	0.035	0.256
Ácido acético, %	60.64	77.77	74.67	0.769	0.0001	0.029
Ácido propiónico, %	23.41	14.18	17.74	0.664	0.0001	0.009
Ácido butírico, %	16.36	7.41	7.72	0.751	0.0002	0.780
CH_4, ml	26.00	11.50	18.50	1.179	0.0001	0.006
CO_2, ml	59.00	59.00	58.00	1.724	0.998	0.696

V max= volumen máximo de gas; S= tasa de producción de gas; Retardo= fase de retardo; DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca; EEM= error estándar de la media. [x]Aditivo herbal Peptasan®.

Análisis metagenómicos

De las 6 muestras se obtuvieron 2'630,796 secuencias brutas en total de la región V3-V4 del gen ARNr 16S, dentro de un rango de 208,618 a 571,150 (promedio de 438,466 secuencias por muestra). Después de realizar el filtrado de calidad, así como la detección y eliminación de quimeras (117,294 secuencias), el total de variantes únicas de secuencia de amplicón (ASV, por sus siglas en inglés) analizadas fue de 874,117, en un rango de 67,716 a 213,108 (promedio de 148,216 por muestra). Se calcularon los índices de Shannon (homogeneidad) y Simpson recíproco (diversidad), así como el estimador de riqueza Chao1, para cada tratamiento (Cuadro 3), habiéndose normalizado a 20,000 secuencias.

Cuadro 3: Efectos de un fitobiótico a base de *Acacia concinna* y un suplemento comercial que contiene el alga roja *Palmaria palmata* sobre la diversidad microbiana ruminal

	Testigo	**Alga roja**	**Aditivo herbal[X]**	**EEM**	**Valor *P***
Chao1	804.917	857.677	495.619	67.721	0.0595
Shannon	4.3405	4.8785	4.417	0.830	0.874
Simpson recíproco	3.971	5.008	5.018	1.063	0.750

EEM= error estándar de la media. [X]: Aditivo herbal Peptasan®.

El análisis de los índices de diversidad alfa de las comunidades microbianas del rumen no mostró diferencias significativas entre tratamientos. No obstante, la tendencia a disminuir la riqueza de especies se detectó en presencia del aditivo poliherbal (Cuadro 3, Chao1), probablemente debido a la presencia de diversos metabolitos secundarios de la planta con actividad antimicrobiana, como se discutirá más adelante.

En cualquiera de las muestras se identificaron 21 familias de bacterias/arqueas con una abundancia relativa >0.1 % (Cuadro 4); las familias con menor abundancia se agruparon en "otras". No se detectaron diferencias significativas (P>0.05) para la mayoría de las familias microbianas. La abundancia de *Archaea* metanogénica no se vio afectada con el producto herbal, pero aparentemente aumentó en un 50 % con el alga roja. La abundancia de *Rikenellaceae* se redujo en un 8 % con el alga roja y en un 36 % con el aditivo herbal, así como las *Micrococcaceae*, que aparentemente desaparecen con el alga roja, y se redujo en un 93 % con el aditivo herbal. La familia *Microbacteriaceae* solo pudo ser detectada en los tratamientos con el aditivo herbal, lo que también ocurrió con *Corynebacteriaceae* y *Sanguibacteraceae*, aunque sin una diferencia estadísticamente significativa. A su vez, *Cellulomonadaceae* se incrementó en 650 % con el alga roja y 9,000 % (P>0.001) con el aditivo.

Cuadro 4: Efectos de un fitobiótico a base de *Acacia concinna* y un suplemento comercial que contiene el alga roja *Palmaria palmata* sobre las abundancias relativas microbianas ruminales (a nivel de familia) evaluadas *in vitro*

					Contraste valor-*P*	
	Testigo	**AR**	**AH**	**EEM**	**Testigo *vs* AR**	**Testigo *vs* AH**
Methanobacteriaceae	0.200	0.300	0.200	0.081	0.4502	0.999
Corynebacteriaceae	0.000	0.000	0.900	0.519	0.999	0.3081
Nocardiaceae	0.050	0.000	18.500	10.681	0.997	0.309
Cellulomonadaceae	0.100	0.750	9.100	0.436	0.370	0.0007
Microbacteriaceae	0.000	0.000	0.900	0.519	0.999	0.308
Micrococcaceae	32.900	0.000	2.450	19.047	0.309	0.340
Sanguibacteraceae	0.000	0.000	2.100	1.212	0.999	0.308
Coriobacteriaceae	0.400	0.400	0.350	0.064	0.999	0.622
Prevotellaceae	7.400	9.050	5.350	3.190	0.738	0.680
Rikenellaceae	2.500	2.300	1.600	0.355	0.717	0.171
Bacillaceae	0.050	0.100	0.100	0.028	0.308	0.309
Paenibacillaceae	0.250	0.500	0.450	0.227	0.493	0.577
Carnobacteriaceae	3.200	16.750	4.250	5.965	0.206	0.908
Streptococcaceae	28.500	42.700	33.150	10.770	0.420	0.780
Lachnospiraceae	3.000	2.250	1.850	0.917	0.603	0.440
Christensenellaceae	11.550	14.000	11.700	5.559	0.775	0.986
Ruminococcaceae	2.250	2.400	2.000	0.693	0.888	0.815
Erysipelotrichaceae	1.000	0.650	0.550	0.122	0.136	0.080
Acidaminococcaceae	0.700	0.550	0.650	0.123	0.450	0.791
Veillonellaceae	0.500	1.300	0.700	0.282	0.139	0.651
Succinivibrionaceae	2.650	3.100	1.650	1.060	0.783	0.552
Otros	2.800	2.900	1.500	0.624	0.917	0.237

AR= alga roja; AH= aditivo herbal; EEM= error estándar de la media. AH= Aditivo herbal Peptasan®.

Discusión

Los estudios *in vitro* han sido utilizados para identificar productos que pueden reducir el metano ruminal; sin embargo, se requieren evaluaciones *in vivo* para confirmar los resultados en la salud y producción animal[39]; asimismo, los factores que pueden alterar los resultados deben considerase para diseñar condiciones de muestreo e incubación[25] que revelen información útil.

Existe un interés mundial en encontrar aditivos alimentarios para reducir las emisiones de metano ruminal, utilizando inhibidores metabióticos de metano[40], algas marinas[41] y otros fitobióticos. Bunglavan *et al*[42] evaluaron varias hierbas y sus extractos en cuanto a su potencial para reducir la producción de metano. Según estos autores, los extractos de *Acacia concinna* tenían el mayor potencial para inhibir la metanogénesis en comparación con los de otras hierbas, lo que confirma los resultados encontrados aquí.

Palmaria palmata contenía altos niveles de alcanos (Cuadro 1), como el heptadecano, que, al igual que el 10, 14-trimetil-2-pentadecanona, tienen propiedades antidiarreicas al desactivar la enzima arginina descarboxilasa en *Campylobacter*[43]; además, el alga roja tiene otros metabolitos con efectos antibacterianos como el ácido 6,1,2-bencenodicarboxílico, el éster de diisooctilo[44], 2(4H)-benzofuranona, 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetilo-, (R)[45], Silano, 1,4-fenilenbis-trimetil-[46] y 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol[47]. Estos hallazgos explican los cambios en los niveles de AGV, a pesar de que hubo pocos cambios en las familias detectadas (Cuadro 4). Por lo tanto, es posible que los metabolitos de las algas rojas hayan afectado a los protozoos ruminales que están implicados en la metanogénesis y el patrón de fermentación[48]. *Palmaria palmata* también contiene un compuesto halogenado de bajo peso molecular, a saber, 2(3H)-furanona, dihidro-5-tetradecilo, que puede ser responsable de la reducción de metano ruminal. El patrón de fermentación sugiere que los compuestos halogenados redujeron el metano ruminal mediante genes de inhibición que expresan enzimas involucradas en la síntesis de metano, como la metil-coenzima M reductasa (MCR)[49], de forma similar al inhibidor 3-NOP, diseñado para inhibir la MCR, que es esencial para la metanogénesis de las arqueas[40]. El metano puede reducirse, no necesariamente asociado a una reducción de la abundancia de *Archaea*, sino a la interferencia en una etapa de la metanogénesis. Los compuestos del alga roja modificaron la fermentación ruminal y los patrones de AGV, inhibiendo la vía hidrogenotrófica de la metanogénesis[20]. Las reducciones de metano *in vitro* fueron significativas (98.9 %[12] y 99 %[5]) con *Asparagopsis taxiformis*, mientras que la reducción *in vivo* fue menor, entre 29.4 y 34.4 %[13].

La reducción de metano con el aditivo herbal podría explicarse por la acción antimetanogénica de las saponinas[50] y por la presencia de otros metabolitos con efectos antibacterianos y antiprotozoarios, como alcaloides, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y terpenoides[51,52], que pueden modular la fermentación ruminal y mejorar el uso de nutrientes[53]. En el presente estudio, la abundancia de *Methanobacteriaceae* no fue afectada significativamente. El aditivo herbal también contiene otros metabolitos secundarios, entre los que se encuentran alcanos como el dotriacontano, el triacontano y el docosano[7], con propiedades antivirales[54] y antibacterianas[55]. En general, la actividad antibacteriana de este aditivo herbal podría atribuirse a metabolitos como el triacontano[55], ácido oleico[56], docosano[57], cinamato de cinamilo[58], éster metílico del ácido hexadecanoico[59] y timol[60-63]. El contenido de saponina en el aditivo herbal es del 15 % de MS[3].

Los aditivos con altos niveles de saponina han sido evaluados en corderos[6] y terneros[7] y han resultado en una reducción del rendimiento de los animales a concentraciones dietéticas más altas, reduciendo la digestibilidad de la MS de forma lineal con una concentración creciente de aditivos[6]. No obstante, en otros estudios, los aditivos ricos en saponinas mejoraron el rendimiento de los corderos en corderos no desparasitados[64] y las respuestas del sistema inmune en terneros[7], lo que puede explicarse por sus propiedades antihelmínticas[3]. A bajas concentraciones en la dieta, las saponinas son beneficiosas para los rumiantes al mejorar la eficiencia de la fermentación, disminuir las poblaciones de protozoos y, en consecuencia, reducir la abundancia de *Archaea* metanogénica[8-11]. Los efectos antiprotozoarios de las saponinas se deben a su capacidad de formar complejos irreversibles con la membrana celular lipídica del protozoo, causando ruptura de membrana, lisis celular y muerte[65].

Comparativamente, la magnitud de la reducción de metano con *Palmaria palmata* fue mayor que la observada con el aditivo herbal. Abbott *et al*[41] observaron efectos de mitigación de CH_4 con la adición de algunas especies de algas rojas (*Gigartina* spp., *Gracilaria vermiculophylla*, *Laurencia filiformis* y *Hypnea pannosa*) a concentraciones comprendidas entre el 40 y el 60 % (y a altas concentraciones de materia seca). Por el contrario, el alga roja *Asparagopsis taxiformis* redujo el CH_4 en aproximadamente un 100 % a concentraciones superiores y alrededor del 1 % de la materia seca. Machado *et al*[5] también informaron que *Asparagopsis taxiformis* al 2 % de la materia seca o el análogo halogenado de metano bromoformo (5 µM) *in vitro* redujeron la producción de metano en más de un 99 %. Se necesitan más estudios *in vivo* para determinar los niveles de inclusión de *Palmaria palmata* que pueden reducir la emisión de metano sin afectar el rendimiento productivo[20,66]. Dado que los resultados *in vitro* muestran una reducción de propionato, la inclusión de *Palmaria palmata* podría reducir la energía de los AGV para los rumiantes, por lo que es necesario evaluar si esto pudiese compensarse con la energía ahorrada en el metano ruminal.

Las estimaciones estequiométricas de metano y CO_2 con las ecuaciones simplificadas de Van Soest[67] resultaron en valores similares a los mostrados en el Cuadro 2 para los niveles de CO_2 de los diferentes tratamientos, mientras que, para el CH_4, los valores estimados fueron 29 % superiores para el testigo. Con la adición de *Palmaria palmata* y el aditivo herbal, los valores estimados fueron 240 % y 99 % superiores, respectivamente, a los observados. Esto indica que el H está siendo incorporado en vías alternativas en presencia de ambos aditivos, posiblemente en la acetogénesis reductora (reducción de CO_2 con H_2 a acetato), en el ciclo del NH_4 y en la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados[68], vías que no son consideradas con el modelo estequiométrico, lo que podría explicar la mayor concentración de acetato observada con el alga roja. Otras algas marinas (*Macrocystis pyrifera*, *Ulva* spp., *Mazzaella* spp.; algas rojas) han mostrado aumentos o reducciones en la concentración de AGV, han sido consistentes en el aumento de propionato *in vitro*[69].

Ambos aditivos contienen ácidos grasos insaturados, donde los dobles enlaces siguen a la biohidrogenación, lo que requiere H en el rumen[70]. El aditivo herbal contiene ácido oleico[7], mientras que *Palmaria palmata* contiene ácido pentadecanoico, 14-metil-, éster metílico (Cuadro 1), y puede contribuir parcialmente a la reducción de la producción ruminal de CH_4[71]. En futuros estudios será importante caracterizar los metales pesados contaminantes en las algas marinas, ya que algunos son utilizados en la alimentación humana[72] y posiblemente se incluyan investigaciones en la alimentación de los rumiantes.

En su estudio *in vitro*, Choi *et al*[73] evaluaron cuatro especies de algas rojas (*Amphiroa anceps*, *Chondracanthus tenellus*, *Grateloupia elliptica* y *Gracilaria parvispora*) y reportaron niveles de reducción de metano entre el 4.6 % y el 51.5 %, lo que indica que diferentes especies pueden variar en su potencial de fermentación. Terry *et al*[74] reportaron que el alga marina *A. taxiformis in vitro* redujo la concentración de CH_4 hasta en un 95.1 %, reduciendo la concentración total de AGV (reduciendo la proporción de acetato y aumentando la de butirato). En un estudio[75], *A. taxiformis* disminuyó la concentración de metano y la abundancia de arqueas *in vitro*, reduciendo también el nivel total de AGV (al reducir el acetato y aumentar las concentraciones de butirato). Ahmed *et al*[76] incluyeron *A. taxiformis* al 2.5 % *in vitro* y encontraron una reducción del 80 % de CH_4 sin afectar la concentración total de AGV. Otras algas marinas han mostrado inconsistencia en la respuesta de la concentración de AGV, pero consistentemente han aumentado el propionato *in vitro*[69]. En el presente estudio, el metano se redujo en un 29 % con el aditivo herbal y en un 56 % con el alga roja en comparación con el control. La concentración total de AGV se incrementó con la adición de *Palmaria palmata*, lo que podría ser un aspecto positivo porque las intervenciones dietéticas que inhiben la metanogénesis generalmente se asocian con una disminución de la producción de AGV[76].

El hecho de que ambos productos no redujeran la digestibilidad es importante, ya que esta variable es crucial en el rendimiento de los rumiantes[77]. En otro estudio, el aditivo herbal no tuvo ningún efecto sobre la digestibilidad total *in vivo* de la MS en corderos que recibieron 4 g/d[64]. Pocos estudios han investigado los efectos de *Palmaria* sobre la digestibilidad *in vivo*, y no existe información sobre el rendimiento de los rumiantes. Sin embargo, en un estudio *in vitro*, *Palmaria palmata* incrementó la digestibilidad de la MS, destacándose entre otras especies de algas[22]. En cuanto a los efectos de *Asparagopsis taxiformis*, se reportó[41] que su inclusión al 10 % tuvo un efecto perjudicial sobre la degradabilidad ruminal de la materia orgánica. Algunos resultados[78] indican que *Macrocystis pyrifera* y *Ulva* spp. no tienen impacto en la digestibilidad *in vitro* de la MS, mientras que *Mazzaella* spp. reduce la digestibilidad de la MS.

No se conoce tan bien el papel biológico de la familia *Sanguibacteraceae* como de *Cellulomonadaceae*, aunque en este trabajo los resultados mostraron un aumento significativo de esta última familia bacteriana en respuesta al aditivo herbal, por lo que sería

recomendable seguir investigando su potencial metabólico como parte de la comunidad microbiana ruminal. La significancia biológica de algunas otras familias bacterianas como *Micrococcaceae*, *Microbacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*, no está clara, pero se han relacionado con la producción de compuestos sulfurados volátiles (CSV) -excepto los tioésteres-[79]; no obstante, los datos no permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas entre ellas en respuesta a los tratamientos. En estudios previos, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la abundancia de las familias de bacterias celulolíticas[80,81], las cuales están asociadas a una mayor proporción de acetato[82], lo que coincide con la digestibilidad no afectada. La disminución del propionato podría atribuirse a la disminución de la abundancia de especies de la familia *Rikenellaceae*, capaces de producir succinato, que posteriormente es catabolizado a propionato[82,83]. Estos resultados confirman el potencial de los productos evaluados para proporcionar beneficios para el rendimiento de los rumiantes. El potencial para modificar la fermentación ruminal y reducir las emisiones de metano debería mejorar la eficiencia alimentaria en rumiantes[52].

Conclusiones e implicaciones

Los resultados confirman que el producto herbal a base de *Acacia concinna* y el alga roja *Palmaria palmata* tienen metabolitos que pueden reducir el metano ruminal por diferentes mecanismos de acción. El potencial reductor de metano de ambos aditivos debe ser corroborado con estudios *in vivo* para verificar si el perfil de fermentación podría ser un inconveniente para la energía obtenida a partir de ácidos grasos volátiles.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Indian Herb Specialties Pvt y Nuproxa México por proporcionar el producto herbal. Asimismo, a la SECIHTI (antes CONAHCYT) por la beca 963486 recibida por OPP y su Programa de Investigadores por México (antes Cátedras CONAHCYT) al que pertenece METH.

Literatura citada:

1. Benaouda M, González-Ronquillo M, Molina LT, Castelán-Ortega OA. Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de mitigación en América Latina. Rev Mex Cienc Agric 2017;8(4):965-74.

2. Ku-Vera JC, Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar SS, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, Arango J, *et al*. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. Front Vet Sci 2020;7.

3. Sánchez-Hernández C, Castañeda-Gómez CJ, Trejo-Castro L, Mendoza-Martínez G, Gloria-Trujillo A. Evaluation of a feed plant additive for coocidiosis control in broilers herbals for coccidiosis control. Braz J Poult Sci 2019;21(01):eRBCA-2019-0846.

4. Becker PM, van Wikselaar PG, Franssen MCR, de Vos RCH, Hall RD, Beekwilder J. Evidence for a hydrogen-sink mechanism of (+) catechin-mediated emission reduction of the ruminant greenhouse gas methane. J Metabolomics 2014;10(2):179-89.

5. Machado L, Tomkins N, Magnusson M, Midgley DJ, de Nys R, Rosewarne CP. *In vitro* response of rumen microbiota to the antimethanogenic red macroalga *Asparagopsis taxiformis*. Microb Ecol 2018;75(3):811-818.

6. Orzuna-Orzuna JF, Dorantes-Iturbide G, Lara-Bueno A, Mendoza-Martínez GD, Miranda-Romero LA, Hernández-García PA. Growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites of lambs supplemented with a polyherbal mixture. Animals 2021;11(4):955.

7. Lee-Rangel HA, Mendoza-Martinez GD, Martínez-García JA, Espinosa-Ayala E, Hernández-García PA, Cifuentes-López RO, *et al*. An Indian polyherbal phytogenic source improved blood serum biochemistry and immune response of dairy calves. Food Agric Immuno 2022;33(1):97-112.

8. Patra AK, Saxena J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry 2010;71(11):1198-222.

9. Zhou YY, Mao HL, Jiang F, Wang JK, Liu JX, McSweeney CS. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. Anim Feed Sci Technol 2011;166-167:93-100.

10. Goel G, Makkar HPS. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. Trop Anim Health 2012;44(4):729-739.

11. Ortiz D, Posada S, Noguera R. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. Livest Res Rural Dev 2014;26(11).

12. Machado L, Magnusson M, Paul NA, de Nys R, Tomkins N. Effects of marine and freshwater macroalgae on *in vitro* total gas and methane production. PLOS One 2014;9(1):e85289.

13. Roque BM, Salwen JK, Kinley R, Kebreab E. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. J Clean Prod 2019;234:132-138.

14. Stefenoni HA, Räisänen SE, Cueva SF, Wasson DE, Lage CFA, Melgar A, *et al*. Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. J Dairy Sci 2021;104(4):4157-4173.

15. Kinley RD, Tan S, Turnbull J, Askew S, Harris J, Roque BM. Exploration of methane mitigation efficacy using *Asparagopsis*-derived bioactives stabilized in edible oil compared to freeze-dried *Asparagopsis in vitro*. Am J Plant Sci 2022;13(7):1023-41.

16. Ponte JMS, Seca AML, Barreto MC. *Asparagopsis* genus: What we really know about Its biological activities and chemical composition. Molecules 2022;27(6):1787.

17. Li X, Norman HC, Kinley RD, Laurence M, Wilmot M, Bender H, *et al*. *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. Anim Prod Sci 2018;58(4):681-688.

18. Kinley RD, Martinez-Fernandez G, Matthews MK, de Nys R, Magnusson M, Tomkins NW. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. J Clean Prod 2020;259:120836.

19. Roque BM, Venegas M, Kinley RD, de Nys R, Duarte TL, Yang X, *et al*. Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. PLOS One 2021;16(3):e0247820.

20. Min BR, Parker D, Brauer D, Waldrip H, Lockard C, Hales K, *et al.* The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: Challenges and opportunities. Anim Nutr 2021;7(4):1371-1387.

21. Morais T, Inácio A, Coutinho T, Ministro M, Cotas J, Pereira L, *et al*. Seaweed potential in the animal feed: A review. J Mar Sci Eng 2020;8(8):559.

22. Molina-Alcaide E, Carro MD, Roleda MY, Weisbjerg MR, Lind V, Novoa-Garrido M. *In vitro* ruminal fermentation and methane production of different seaweed species. Anim Feed Sci Technol 2017;228:1-12.

23. Werner A, Dring M. Cultivating *Palmaria palmata*: Irish Sea Fisheries Board Dublin; 2011.

24. Grote B. Recent developments in aquaculture of *Palmaria palmata* (Linnaeus) (Weber & Mohr 1805): cultivation and uses. Rev Aqua 2019;11(1):25-41.

25. Yáñez-Ruiz DR, Bannink A, Dijkstra J, Kebreab E, Morgavi DP, O'Kiely P, *et al*. Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. Anim Feed Sci Technol 2016;216:1-18.

26. Roque-Jiménez JA, Mendoza-Martínez GD, Vázquez-Valladolid A, Guerrero-González ML, Flores-Ramírez R, Pinos-Rodriguez JM, *et al*. Supplemental herbal choline increases 5-hmC DNA on whole blood from pregnant ewes and offspring. Animals 2020;10(8):1277.

27. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim Feed Sci Technol 1994;48(3):185-197.

28. Menke HH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim Res Dev 1988;28:7-55.

29. Bartha R, Pramer D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. Soil Sci 1965;100(1):68-70.

30. Hegarty R, Leng R, Nolan JV. Measurement of methane production rate in the rumen using isotopic tracers. Springer; 2007.

31. Ramírez-Díaz R, Pinto-Ruiz R, Miranda-Romero LA, La O, Arias MA, Hernández-Sánchez D, *et al*. Predicción de metano de dos frutos arbóreos por cromatografía de gases y gas i*n vitro*. Ecosis Recur Agropecu 2023;10(3).

32. Erwin E, Marco GJ, Emery E. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. J Dairy Sci 1961;144:1768–1771.

33. Mendoza-Martínez GD, Hernández-García PA, Díaz-Galván C, Razo-Ortiz PB, Ojeda-Carrasco JJ, Sánchez-López N, *et al*. Evaluation of Increasing dietary concentrations of a multi-enzyme complex in feedlot lambs' rations. Animals 2024;14(8):1215.

34. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods 2016;13(7):581-583.

35. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods 2010;7(5):33533-6.

36. Herrera-Haro JG, García-Artiga C, Santoyo-Brito E. Bioestadística en ciencias veterinarias: Procedimientos de análisis de datos con SAS. Bioestadística en ciencias veterinarias: procedimientos de análisis de datos con SAS. 2010.

37. Pinos-Rodríguez JM, González-Muñoz SS, Mendoza-Martínez GD, Martínez-Garza Á. Análisis estadístico de experimentos de digestibilidad *in vitro* con forrajes. Interciencia 2002;27(3):143-146.

38. Mendoza-Martínez GD, Hernández-García PA, Plata-Pérez FX, Martínez-García JA, Arcos-García JL, Lee-Rangel HA. Nutrición animal cuantitativa. Editorial CBS. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2022.

39. Dijkstra J, Kebreab E, Bannink A, France J, López S. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. Anim Feed Sci Technol 2005;123-124:561-578.

40. Pitta DW, Indugu N, Melgar A, Hristov A, Challa K, Vecchiarelli B, *et al*. The effect of 3-nitrooxypropanol, a potent methane inhibitor, on ruminal microbial gene expression profiles in dairy cows. Microbiome 2022;10(1):146.

41. Abbott DW, Aasen IM, Beauchemin KA, Grondahl F, Gruninger R, Hayes M, *et al*. Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: Challenges and opportunities. Animals 2020;10(12):2432.

42. Bunglavan S, Valli C, Ramachandran M, Balakrishnan V. Effect of supplementation of herbal extracts on methanogenesis in ruminants. Livest Res Rural Dev 2010;22(11):216.

43. Nayak S, Sahu S, Biswal MK, Dash S, Parida S, Pattanayak S. *Eclipta alba* L. derived phytochemicals against *Campylobacter* causing diarrhea. J Pharm Res Int 2020;32:108-111.

44. Fadipe L, Haruna A, Mohammed I. Antibacterial activity of 1, 2-benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester isolated from the ethyl acetate soluble sub-portion of the unripe fruits of *Nauclea latifolia*. Int J Pure Appl Biosci 2014;2(1):223-230.

45. Akhbari M, Batooli H, Kashi FJ. Composition of essential oil and biological activity of extracts of *Viola odorata* L. from central Iran. Iran. Nat Prod Res 2012;26(9):802-809.

46. Alexpandi R, Ponraj JG, Swasthikka RP, Abirami G, Ragupathi T, Jayakumar R, *et al*. Anti-QS mediated anti-infection efficacy of probiotic culture-supernatant against *Vibrio campbellii* infection and the identification of active compounds through *in vitro* and *in silico* analyses. Biocatal Agric Biotechnol 2021;35:102108.

47. Yu J, Lei J, Yu H, Cai X, Zou G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. Phytochemistry 2004;65(7):881-884.

48. McAllister TA, Newbold CJ. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Aust J Exp Agric 2008;48(2):7-13.

49. Oremland RS, Capone DG. Use of "Specific" Inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. In: Marshall KC, editor. Adv Microb Ecol. Boston, MA: Springer US; 1988.

50. Ugbogu EA, Elghandour MMMY, Ikpeazu VO, Buendía GR, Molina OM, Arunsi UO, *et al.* The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. J Clean Prod 2019;213:915-925.

51. Kumar M, Kumar V, Roy D, Kushwaha R, Vaiswani S. Application of herbal feed additives in animal nutrition-a review. Int J Livest Res 2014;4(9):1-8.

52. Kuralkar P, Kuralkar SV. Role of herbal products in animal production – An updated review. J Ethnopharmacology 2021;278:114246.

53. Tajodini M, Moghbeli P, Saeedi H, Effati M. The effect of medicinal plants as a feedadditive in ruminant nutrition. Iran J Appl Anim Sci 2014;4(4).

54. Chathuranga K, Weerawardhana A, Dodantenna N, Ranathunga L, Cho WK, Ma JY, *et al.* Inhibitory effect of *Sargassum fusiforme* and its components on replication of respiratory syncytial virus *in vitro* and *in vivo*. Viruses 2021;13(4):548.

55. Amudha P, Jayalakshmi M, Pushpabharathi N, Vanitha V. Identification of bioactive components in *Enhalus acoroides* seagrass extract by gas chromatography-mass spectrometry. Asian J Pharm Clin Res 2018;11(10):313-315.

56. Farhan SR, AL-Azawi AH, Salih WY, Abdulhassan AA. The antibacterial and antioxidant activity of *Moringa oleifera* seed oil extract against some foodborne pathogens. Indian J Forensic Med Toxicol 2021;15(4):2529-2538.

57. Uma B, Parvathavarthini R. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884). Int J Pharmtech Res 2010;2(3):1677-1680.

58. Sahinler N, Kaftanoglu O. Natural product propolis: chemical composition. Nat Prod Res 2005;19(2):183-188.

59. Shaaban MT, Ghaly MF, Fahmi SM. Antibacterial activities of hexadecanoic acid methyl ester and green-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. J Basic Microbiol 2021;61(6):557-568.

60. Acevedo AM, Castañeda ML, Blanco KM, Cardenas CY, Reyes JA, Kouznetsov VV, *et al.* Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Sci Technol 2007;13(33):125-128.

61. Gallegos-Flores PI, Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Meza-López C, Echavarría-Cháirez F. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α-terpineno y timol. Trop Subtrop Agroecosyst 2019;22(2):241-248.

62. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. J Anim Sci Biotechnol 2015;6(1):58.

63. Di Pasqua R, Mamone G, Ferranti P, Ercolini D, Mauriello G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. Proteomics 2010;10(5):1040-1049.

64. Mejia-Delgadillo M, Lee-Rangel H, Hernandez-Garcia P, Vazquez-Valladolid A, Mendez-Cortes H, Guerra-Liera J, *et al.* Effect of a polyherbal additive on performance and parasite infection of hair creole ewes. Indian J Anim Res 2021;1(1-5).

65. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. Br J Nutr 2002;88(6):587-605.

66. Jard G, Marfaing H, Carrère H, Delgenes JP, Steyer JP, Dumas C. French Brittany macroalgae screening: Composition and methane potential for potential alternative sources of energy and products. Bioresour Technol 2013;144:492-498.

67. Van Soest P. Nutritional ecology of the ruminant: Cornell University Press; 1994.

68. Ungerfeld EM. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. Front Microbiol 2020;11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589

69. De la Cruz Gómez AG, Campos-García H, Mendoza GD, García-López JC, Álvarez-Fuentes G, Hernández-García PA, *et al.* Macroalgae compound characterizations and their effect on the ruminal microbiome in supplemented lambs. Vet Sci 2024;11(12):653.

70. Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. J Animal Sci 2008;86(2):397-412.

71. Ungerfeld EM. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. Front Microbiol 2015;6.

72. Lindenmayer R, Lu L, Eivazi F, Afrasiabi Z. Atomic spectroscopy-based analysis of heavy metals in seaweed species. Appl Sci 2023;13(8):4764.

73. Choi Y, Lee S, Kim H, Eom J, Jo S, Guan L, *et al.* Red seaweed extracts reduce methane production by altering rumen fermentation and microbial composition *in vitro*. Front Vet Sci 2022;9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.985824

74. Terry SA, Krüger AM, Lima PMT, Gruninger RJ, Abbott DW, Beauchemin KA. Evaluation of rumen fermentation and microbial adaptation to three red seaweeds using the rumen simulation technique. Animals 2023;13(10):1643.

75. O'Hara E, Terry SA, Moote P, Beauchemin KA, McAllister TA, Abbott DW, *et al*. Comparative analysis of macroalgae supplementation on the rumen microbial community: *Asparagopsis taxiformis* inhibits major ruminal methanogenic, fibrolytic, and volatile fatty acid-producing microbes *in vitro*. Front Microbiol 2023;14.

76. Ahmed E, Suzuki K, Nishida T. Micro- and Macro-Algae combination as a novel alternative ruminant feed with methane-mitigation potential. Animals 2023;13(5):796.

77. Mendoza-Martínez G, Plata-Pérez F, Espinosa-Cervantes R, Lara-Bueno A. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. Universidad y Ciencia 2008;24(1):75-87.

78. Lee-Rangel H, Roque-Jiménez J, Cifuentes-López R, Álvarez-Fuentes G, Cruz-Gómez A, Martínez-García J, *et al.* Evaluation of three marine algae on degradability, *in vitro* gas production, and CH4 and CO_2 emissions by ruminants. Fermentation 2022;8(10):511.

79. Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, *et al*. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int J Food Microbiol 2014;177:136-154.

80. Geier RR, Kwon IH, Cann IK, Mackie RI. Interspecies hydrogen transfer and its effects on global transcript abundance in *Ruminococcus albus*, a predominant fiber-degrading species in the rumen. FASEB J 2016;30(S1):1102.1-.1. https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.1102.1.

81. Ramírez-Bribiesca J. Eventos químicos-fisiológicos del metano en los rumiantes. Agro Productividad 2018;11(2).

82. Andrade BGN, Bressani FA, Cuadrat RRC, Cardoso TF, Malheiros JM, de Oliveira PSN, *et al.* Stool and ruminal microbiome components associated with methane emission and feed efficiency in Nelore beef cattle. Front Genet 2022;13.

83. Bach A, López-García A, González-Recio O, Elcoso G, Fàbregas F, Chaucheyras-Durand F, *et al.* Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. J Dairy Sci 2019;102(7):6180-6198.