



FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* DE DIETAS PARA OVINOS CON INCLUSIÓN DE TANINOS CONDENSADOS Y NIVELES CRECIENTES DE ACEITE DE ORÉGANO (*Lippia graveolens*)[†]

[*IN VITRO* RUMEN FERMENTATION AND METHANE PRODUCTION OF SHEEP DIETS WITH THE INCLUSION OF CONDENSED TANNINS AND INCREASING LEVELS OF OREGANO OIL (*Lippia graveolens*)]

A. Muñoz-Cuautle¹, M. E. Ortega-Cerrilla¹, J. G. Herrera-Haro¹, J. E. Ramírez-Bribiesca¹ and P. Zetina-Córdoba^{2*}

¹Colegio de Postgraduados, Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, 56230, Texcoco, Estado de México, México. Email: adrianmcua@hotmail.com, meoc@colpos.mx, haro@colpos.mx, efrenrb@colpos.mx

²Universidad Politécnica de Huatusco, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Calle 9 sur, 94100, Huatusco de Chicuéllar, Veracruz, México. Email: mtro.pedro.zetina17@uphuatusco.edu.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Ruminants have been related to greenhouse gas production. Therefore, it has been necessary to find alternatives by using natural additives to reduce their production by modulation of rumen fermentation. **Objective.** It was to evaluate the effect of the addition of condensed tannins (CT) and different levels of essential oregano oil (*Lippia graveolens*) (EOO) in sheep's diets on *in vitro* fermentation products such as total gas production, methane (CH₄), carbon dioxide (CO₂), pH, ammoniacal nitrogen (N-NH₃), and volatile fatty acids (VFA). **Methodology.** There were evaluated six experimental diets: the control diet with 4% of CT kg/DM, and 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 or 0.10% of EOO kg/DM, respectively. Total gas production, CH₄, CO₂, pH, N-NH₃, and AGV were measured at different *in vitro* incubation times. **Results.** Total gas production was not affected ($P > 0.05$) due to treatment or the interaction treatment*time. An exponential increment was observed ($P < 0.05$) according to incubation time. CH₄ and CO₂ production increased at 48 h. The lowest emissions of these gases were recorded when 0.04, 0.06, 0.08, and 1% of EOO were added to the diet. Nevertheless, no differences were found ($P > 0.05$) due to treatment or the interaction treatment*time. Acetic and butyric acid concentrations were affected due to incubation time and the interaction treatment*time; however, there was no effect due to treatment ($P > 0.05$). Propionic acid production and pH were not affected ($P > 0.05$) due to treatment, time, or interaction treatment*time. N-NH₃ production increased through incubation time ($P < 0.05$), with the highest concentration at 48 h for all treatments, without differences ($P > 0.05$) due to treatment or interaction treatment*time. **Implications.** These results suggest that the inclusion levels of TC and EOO in the diet were not enough to affect rumen fermentation or methane production. Therefore, it is necessary to evaluate higher levels of these compounds in sheep's diets. **Conclusion.** The addition of CT or the different levels of EOO included in sheep's diets evaluated in this study did not affect total gas production, CH₄, CO₂, pH, concentration of N-NH₃, AGV, and pH.

Key words: rumen fermentation; volatile fatty acids; ammoniacal nitrogen; methane.

RESUMEN

Antecedentes. Los rumiantes se han identificado como fuente de gases de efecto invernadero, lo que ha propiciado la búsqueda de alternativas con aditivos naturales que permitan disminuir su producción por medio de la modulación de la fermentación ruminal. **Objetivo.** Evaluar los productos de la fermentación *in vitro* de gases totales, metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV), por efecto de la adición de taninos condensados (TAN) y diferentes niveles de aceites esenciales de orégano (AEO) en dietas para ovinos en crecimiento. **Metodología.** Siete dietas experimentales fueron evaluadas: dieta base (control), dieta base con 4% de TAN en MS, dieta base con 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10% de AEO/kg MS, respectivamente. Se cuantificó la producción gases totales, CH₄, CO₂, pH, N-NH₃ y AGV, a diferentes tiempos de incubación *in vitro*. **Resultados.** La

[†] Submitted February 16, 2022 – Accepted April 12, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4245>



producción de gas no fue afectada ($P > 0.05$) por los tratamientos y la interacción tratamiento*tiempo, conforme al tiempo, se observó un incremento exponencial ($P < 0.05$). La producción de CH_4 y CO_2 a las 48 h se incrementó ($P < 0.05$), observándose las menores emisiones cuando se incluyó 0.04, 0.06, 0.08% y 0.04, 0.08 y 1% de AEO en la dieta, para CH_4 y CO_2 , respectivamente; no se detectaron diferencias ($P > 0.05$) por efecto del tratamiento o interacción tratamiento*tiempo. La concentración de ácido acético y butírico fue afectada ($P < 0.05$) por el tiempo de incubación y la interacción tratamiento*tiempo, pero los tratamientos no influyeron ($P > 0.05$) en los mismos; sin embargo, el ácido propiónico no presentó variación ($P > 0.05$) debido al tratamiento, tiempo e interacción, situación similar con el pH. La concentración de N-NH_3 aumentó a través del tiempo ($P < 0.05$), observando la mayor concentración a las 48 h en todos los tratamientos, sin observar diferencias ($P > 0.05$) debido al tratamiento o a la interacción tratamiento*tiempo. **Implicaciones.** Los resultados sugieren que los niveles de inclusión en la dieta de taninos condensados y AEO, no fueron suficientes para impactar la fermentación ruminal y la producción de metano, por lo que es indispensable considerar evaluaciones con inclusiones mayores. **Conclusión.** La adición de TC o las diferentes dosis de AEO en dietas para ovinos en crecimiento, no afectó la producción *in vitro* de gases, CH_4 , CO_2 , pH y concentración de N-NH_3 , AGV y pH.

Palabras clave: fermentación ruminal; ácidos grasos volátiles; nitrógeno amoniacal; metano.

INTRODUCCIÓN

Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) ha llevado a buscar alternativas que reduzcan la producción de metano (CH_4), considerando que su potencial de calentamiento es 25% más que el dióxido de carbono (CO_2) (Benzaar *et al.*, 2008; Tekeli *et al.*, 2017). Particularmente, el sector agropecuario aporta alrededor de 13% de la emisión total de GEI en el mundo, 80% del óxido nítrico y el 50% de CH_4 (Benaouda *et al.*, 2017); en este contexto, la fermentación entérica de los rumiantes produce CH_4 , representando una de las principales fuentes de emisión y su formación depende del tipo así como presentación del alimento, microflora ruminal, estado fisiológico y parámetros productivos del animal (Benaouda *et al.*, 2017; Benchaar y Greathead, 2011; Dämmgen *et al.*, 2012). La producción de CH_4 en los rumiantes constituye una pérdida de la eficiencia nutricional que alcanza el 7% de la energía bruta consumida, lo que afecta la producción en los sistemas pecuarios (Bonilla y Lemus, 2012; Hill *et al.*, 2016; Prieto *et al.*, 2017). Se han investigado diversas alternativas para mitigar las emisiones de CH_4 sin afectar el rendimiento productivo del animal, por ejemplo, compuestos secundarios de plantas contenidos en los aceites esenciales (AE) (Cobellis *et al.*, 2015). Los AE son una mezcla compleja que pueden tener de 20 a 60 componentes y varían en su concentración. La mayoría de los componentes se encuentran presentes en cantidades trazas y únicamente dos o tres se encuentran en concentraciones altas (20-70%). Se tienen dos grupos de compuestos: los terpenos y terpenoides y el otro de aromáticos y constituyentes alifáticos; ambos de bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008). Los AE tienen un efecto antimicrobiano contra diversos microorganismos como protozoarios, bacterias y hongos. Los terpenoides y fenil-terpenoides tienen efecto contra bacterias Gram+, afectando la membrana celular de éstas, causando cambios morfológicos en la

estructura de la membrana (Benzaar *et al.*, 2008; Cobellis *et al.*, 2015; Polin *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de la adición de taninos y aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en la fermentación ruminal y producción de metano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dietas experimentales para la producción de gas *in vitro*

Se formularon siete dietas integrales para ovinos en crecimiento (NRC, 2007) para la evaluación de producción de gas *in vitro* (Theodorou *et al.*, 1994) De lo anterior, se establecieron 7 tratamientos: una dieta base (control), inclusión de taninos condensados (TAN) (4% MS), e inclusión de niveles crecientes de aceite esencial de orégano (AEO) [AEO₀₂ (0.02%)], [AEO₀₄ (0.04%)], [AEO₀₆ (0.06%)], [AEO₀₈ (0.08%)], [AEO₁ (0.1%)] (Tabla 1). Se utilizó una fuente comercial de taninos condensados (SilvaFeed® 86%) y de aceite de orégano (*Lippia graveolens*) [ORE®: carvacrol (50.21%), p-cimeno (29.13%), timol (3.72%)]. Las dietas experimentales se molieron (Wiley, Thomas Scientific®) con tamiz de 1 mm; y se determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas y extracto etéreo (EE) (AOAC, 2012); así como fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991).

Producción de gases totales

El líquido ruminal se obtuvo de tres novillos Holstein con cánula ruminal permanente, alimentados con una dieta con 18% de PC, 40% de FDN, 20% de FDN y 2.5 Mcal de EM kg/MS. La extracción del líquido ruminal se realizó 2 h después de proporcionar la dieta matutina, inmediatamente se filtró con cuatro capas de gasa y se mantuvo en condiciones anaerobias a una temperatura de 39 °C. Se utilizaron frascos de vidrio

ámbar de 120 ml (biodigestores) sellados con tapón de hule de neopreno y casquillo de aluminio de 20 mm con centro removible; se agregaron 0.5 g de dieta experimental y 60 ml de una mezcla de líquido ruminal y solución buffer. Los frascos se mantuvieron con un flujo constante de CO₂. Posteriormente, se cerraron herméticamente y colocaron en baño maría a 39 °C. La lectura de la presión de gas *in vitro* se determinó por triplicado insertando una aguja acoplada a un manómetro (Metron modelo 63100, Finesa) con escala de 0 a 1 kg/cm a 6, 12, 24 y 48 h de incubación, para la corrección de producción de gas a partir del líquido ruminal, se utilizaron cuatro botellas sin sustrato como blancos. Las lecturas de presión (kg cm⁻²) se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal $V=(P+0.0145)(0.018)^{-1}$ (Ørskov y McDonald, 1979).

Determinación de CH₄ y CO₂

A 24 y 48 h de incubación, se tomaron muestras de gas para la medición por triplicado de la producción de CH₄ y CO₂ en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500), donde las temperaturas del horno, columna y detector de conductividad térmica fueron de 80, 170 y 130 °C, respectivamente. La cantidad de muestra inyectada fue de 0.3 ml, con un tiempo de retención de 0.73 y 1.05 min, para CH₄ y CO₂, respectivamente.

Determinación de pH, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles

Para la cuantificación del pH, se utilizó un potenciómetro (Thermo Scientific, Orion modelo 250A). Para la determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), del líquido obtenido en las pruebas de producción de gas, se tomaron 2 ml a las 6, 12, 24 y 48 h, se mezclaron con ácido metafosfórico (25% p/v) en una relación 4:1, y se refrigeraron a -20°C hasta su posterior el análisis. Las muestras se centrifugaron (EBA 21, Hettich) a 15,000 rpm x 15 min; del sobrenadante se tomaron 20 µl y depositaron en tubos de 13x10 mm, inmediatamente se adicionó 1 ml de fenol y 1 ml de hipoclorito de sodio basificado con hidróxido de sodio; los tubos se incubaron a 37 °C por 30 min y se agregaron 5 ml de agua destilada. El NH₃ se midió en un fotocolorímetro (CARY 1E, modelo Varian) a una longitud de onda de 530 nm (McCullough, 1967). La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500), columna capilar Elite FFAP. Las temperaturas del horno, columna y detector de conductividad térmica fueron de 140, 200 y 250 °C, respectivamente; se inyectó 1 µl de muestra, con un tiempo de retención de 7 min.

Tabla 1. Composición y análisis químico de las dietas experimentales.

Ingredientes (%)	Tratamientos						
	Control	TAN	AEO ₀₂	AEO ₀₄	AEO ₀₆	AEO ₀₈	AEO ₁
Maíz molido	54	54	53.98	53.96	53.94	53.92	53.90
Melaza	3	3	3	3	3	3	3
Urea	1	1	1	1	1	1	1
Pasta de soya	20	20	20	20	20	20	20
Avena forrajera	20	16	20	20	20	20	20
Aceite esencial de orégano	0	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Taninos condensados	0	4	0	0	0	0	0
Sal mineral	2	2	2	2	2	2	2
Composición química							
Materia seca (MS)	89.5	89.3	88.6	88.1	88.5	89.1	88.0
<i>Como % de la MS</i>							
Proteína cruda	17.59	17.34	17.42	17.39	17.32	17.45	17.64
Extracto etéreo	3.23	3.44	3.35	3.31	2.90	3.025	3.01
Fibra detergente neutro	23.14	20.39	21.70	21.29	24.38	21.89	22.19
Fibra detergente ácido	8.52	8.81	7.85	7.74	7.91	7.70	7.79

TAN: Dieta base + inclusión de 4% de taninos condensados, AEO₀₂, AEO₀₄, AEO₀₆, AEO₀₈, AEO₁: Dieta base + inclusión de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10% de aceite esencial de orégano, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo, mediante el procedimiento PROC MIXED (SAS, 2018) y las diferencias entre medias se estimaron con la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de producción de gas a través del tiempo hasta las 48 h se muestran en la Figura 1, observando una respuesta exponencial en todos los tratamientos. La inclusión de taninos y los diferentes niveles de inclusión de AEO no tuvieron efecto ($P > 0.05$) en la producción de gas; todos los tratamientos presentaron diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tiempo, la interacción tratamiento y tiempo no tuvo efecto ($P > 0.05$) en la producción de gas. Getachew *et al.* (1998) mencionan que el gas se produce por la fermentación de carbohidratos, mientras que la proteína y los lípidos son poco fermentables. La adición de taninos y las diferentes dosis de AEO no afectaron la producción de gas *in vitro* en este estudio.

La concentración de CH_4 y CO_2 no presentaron diferencias ($P > 0.05$) por efecto del tratamiento e interacción tratamiento y tiempo; sin embargo, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) debido al tiempo (Tabla 2).

Los taninos causan un efecto tóxico en las arqueas metanogénicas disminuyendo la producción de metano (Makkar, 2003); sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias ($P > 0.05$) debido al efecto de la adición de 4% de taninos condensados. Se observaron diferencias debido al tiempo, con medias de producción de metano de 2.96 y 4.09% a las 24 y 48 h, respectivamente ($P < 0.05$), sin que tuviera efecto ($P > 0.05$) la interacción tratamiento y tiempo. La producción de CO_2 con la adición de taninos condensados no tuvo efecto por el tratamiento o la interacción tratamiento y tiempo ($P > 0.05$), pero si en el tiempo ($P < 0.05$), obteniendo los siguientes resultados: 28.91 y 34.85 % a las 24 y 48 h, respectivamente. El efecto que pueden tener los taninos sobre la producción de CH_4 depende en mucho de su origen, ya que se pueden obtener de diversas

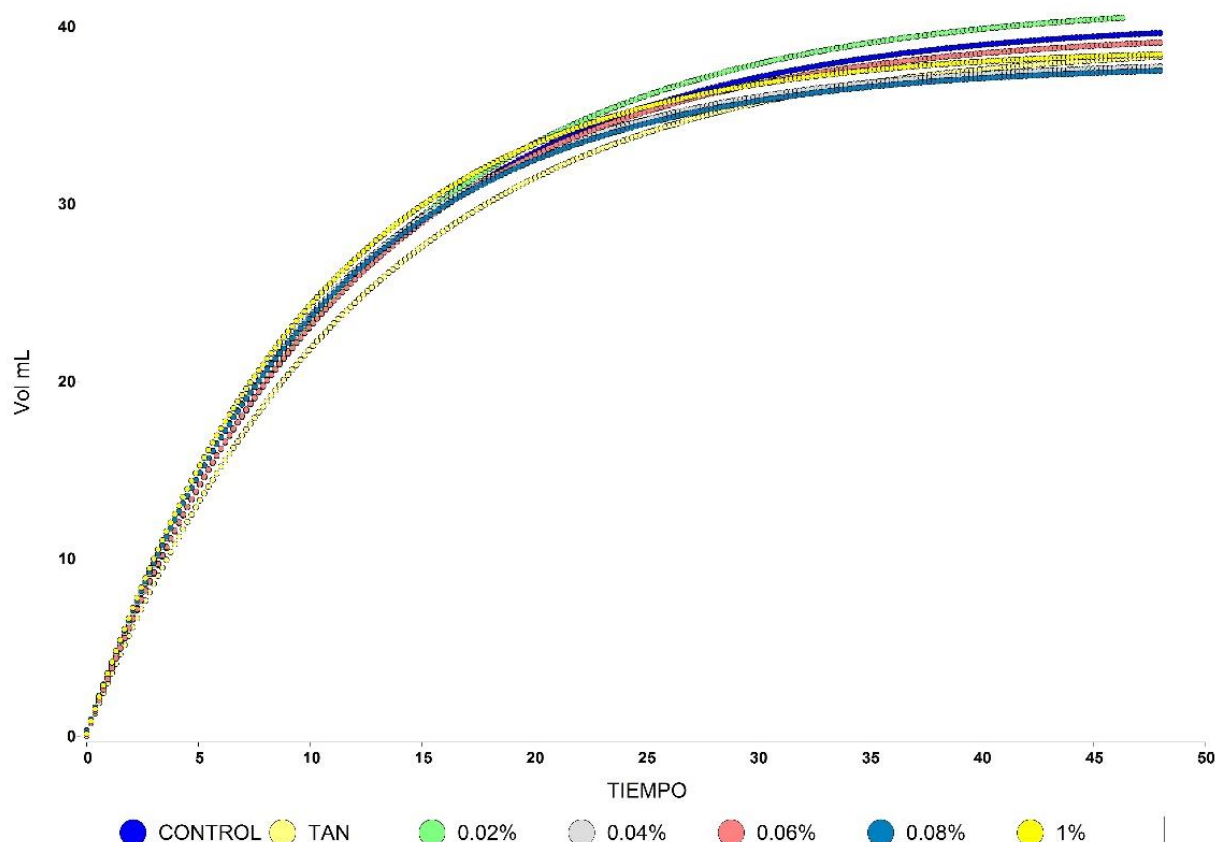


Figura 1. Producción de gases totales a las 6, 12, 24, y 48 h de incubación de la dieta control, 4% de taninos condensados y 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10% de aceite esencial de orégano en dietas para ovinos en crecimiento.

Tabla 2. Producción de metano y dióxido de carbono *in vitro* al incluir taninos y diferentes dosis de aceites esenciales de orégano en dietas para ovinos en crecimiento.

	Control	Tratamientos							P<F	
		TAN	AEO ₀₂	AEO ₀₄	AEO ₀₆	AEO ₀₈	AEO ₁	EEM	Trat	Per
CH ₄ (mL/g MS)										
24 h	3.73	2.96	3.68	3.05	3.47	3.66	3.57	0.37	0.1116	0.0001
48 h	4.31 ^a	4.09 ^b	4.92 ^b	3.94 ^a	4.04 ^a	4.07 ^a	4.20 ^a			0.3991
CO ₂ (mL/g MS)										
24 h	30.43	28.91	29.72	30.18	30.96	29.42	30.37	1.62	0.9311	0.0001
48 h	35.93 ^b	34.85 ^b	36.67 ^b	34.09 ^a	34.86 ^a	34.12 ^b	34.3 ^b			0.4831

TAN: Dieta base + inclusión de 4% de taninos condensados, AEO₀₂, AEO₀₄, AEO₀₆, AEO₀₈, AEO₁: Dieta base + inclusión de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10% de aceite esencial de orégano, respectivamente; CH₄: metano; CO₂: dióxido de carbono.

plantas (Adejoro *et al.*, 2019). Jayanegara *et al.* (2015) obtuvieron resultados positivos con el uso de taninos hidrolizables, e indican que pueden tener un mayor efecto en la reducción de metano en comparación con los condensados. El efecto de los AE sobre la producción de CH₄ y CO₂ se relaciona con una disminución de las arqueas metanogénicas o afectando procesos metabólicos microbianos (Knapp *et al.*, 2014). El tratamiento con 0.02% de AEO presentó diferencias por efecto del tiempo ($P < 0.05$) con medias de 3.68 y 4.92% para las 24 y 48 h, respectivamente. El porcentaje de CO₂ se elevó significativamente ($P < 0.05$) presentando porcentajes de 29.72 y 36.67 a las 24 y 48 h respectivamente, en tanto que el tratamiento y la interacción tratamiento por tiempo no fueron significativos. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la producción de metano y de CO₂ en ninguno de los tratamientos evaluados, así como en el tiempo e interacción tratamiento por tiempo. Cobellis *et al.* (2015) realizaron un estudio *in vitro* y reportaron una reducción de CH₄ y CO₂ al incluir AEO en niveles de 1.0, 1.5 y 2.0 g/l de líquido ruminal, encontrando diferencias entre los niveles evaluados ($P < 0.05$). Posiblemente la diferencia en los resultados con el presente trabajo se deba a la especie utilizada, lo que causó el efecto en la reducción de CH₄ y CO₂. García-Pérez *et al.* (2012) mencionan que existe una variación en la composición fitoquímica del AEO dependiendo del género utilizado.

No se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$) en la producción de ácido acético a las 6, 12, 24 y 48 h. Sin embargo, sí hubo efecto del tiempo y de la interacción tratamiento por tiempo ($P < 0.05$) en que se incrementó a las 48 h en la dieta control y con inclusión de 0.04 y 0.06% de AEO. La producción de ácido propiónico fue similar en todos los tratamientos ($P > 0.05$) en el tiempo e interacción tratamiento por tiempo. En el caso del ácido butírico, tampoco se encontraron diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$), sin embargo, sí se observaron ($P < 0.05$) por la adición de taninos o AEO en el tiempo y la interacción

tratamiento por tiempo, siendo diferente el tratamiento con inclusión de 4% de taninos, 0.02% y 0.04% de AEO a las 48 h con medias de 10.33, 10.85 y 13.19 respectivamente, siendo estos valores superiores al resto de los tratamientos a los mismos tiempos. La producción total de AGV fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento con inclusión de 0.06% de AEO a las 6, 24, 48 h, sin que se encontraran diferencias debido al tratamiento o interacción tratamiento por tiempo (Tabla 3).

La búsqueda de alternativas a los antibióticos ha permitido el desarrollo de diversas investigaciones, donde se utilizan diferentes fuentes naturales, como los aceites esenciales, los cuales tienen variación en la concentración y composición de elementos fitoquímicos (Ünal Baruh y Kocabağlı, 2017), lo que puede afectar la concentración total de AGV. Otro factor es el nivel empleado: Ortiz *et al.*, (2014), y Medjekal *et al.* (2017) evaluaron plantas medicinales (*Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis* y *Zingiber officinale*) y encontraron que su adición en la dieta, la fermentación ruminal *in vitro*, incrementaba la proporción de AGV; en tanto que Wu *et al.* (2018) en un estudio *in vitro* en el que agregaron aceite esencial de cítricos, no encontraron diferencias ($P > 0.05$). Sin embargo, al probarlo *in vivo* observaron que la concentración total de AGV disminuyó al incluirlo en 16 y 8 ml/l de líquido ruminal ($P < 0.05$) en comparación con el tratamiento control. Los resultados concuerdan con los reportes de Ünal Baruh y Kocabağlı (2017), quienes indican un aumento en la concentración de ácido acético y butírico a través del tiempo, pero no debido al tratamiento ($P > 0.05$), sin que se tuvieran diferencias en la concentración de propiónico por el tiempo o tratamiento. Chaves *et al.* (2008) evaluaron el uso de carvacrol y cinamaldehído en niveles de 0.20 g/kg MS, reportando que la concentración total de AGV aumentó en comparación con el tratamiento control, sin que se afectaran las concentraciones individuales de los ácidos acético, propiónico y butírico.

Tabla 3. Concentración de ácidos grasos volátiles a 6, 12, 24 y 48 h en dietas integrales para ovinos con inclusión de taninos y diferentes dosis de aceites esenciales de orégano.

		Tiempo (h)				P<F			
		6	12	24	48	EEM	Trat	Per	Trat*Per
% Acético	Control	70.65 _{ax}	75.45 _{ax}	69.70 _{ax}	73.81 _{abx}				
	TAN	75.71 _{ax}	69.53 _{ax}	68.65 _{ax}	70.45 _{ax}				
	AEO ₀₂	75.18 _{ax}	71.11 _{ax}	63.57 _{ax}	69.97 _{ax}				
	AEO ₀₄	70.51 _{ax}	72.40 _{ax}	66.72 _{ax}	63.00 _{ax}	6.5	0.6959	0.0001	0.0009
	AEO ₀₆	71.63 _{ax}	73.05 _{ax}	65.70 _{ax}	72.82 _{abxy}				
	AEO ₀₈	69.75 _{ax}	57.37 _{ax}	67.70 _{ax}	73.26 _{abxy}				
	AEO ₁	68.55 _{ax}	68.77 _{ax}	69.17 _{ax}	72.15 _{axy}				
% Propiónico	Control	16.18	12.47	16.41	15.10				
	TAN	14.37	16.57	16.55	16.65				
	AEO ₀₂	14.27	15.11	15.83	15.87				
	AEO ₀₄	16.59	16.47	17.45	19.48	2.38	0.5997	0.0594	0.1991
	AEO ₀₆	14.76	16.31	18.32	15.07				
	AEO ₀₈	16.07	17.54	17.72	14.49				
	AEO ₁	16.49	18.43	18.32	15.77				
% Butírico	Control	9.33 _{ax}	8.56 _{ax}	10.53 _{ax}	8.88 _{ax}				
	TAN	7.93 _{ax}	10.11 _{ax}	11.15 _{ax}	10.33 _{abx}				
	AEO ₀₂	8.41 _{ax}	9.60 _{axy}	11.92 _{ay}	10.85 _{abxy}				
	AEO ₀₄	10.32 _{ax}	9.07 _{ax}	11.48 _{ax}	13.19 _{abx}	1.08	0.7327	0.0001	0.0002
	AEO ₀₆	10.20 _{ax}	8.66 _{ax}	11.48 _{ax}	9.22 _{ax}				
	AEO ₀₈	10.76 _{ax}	7.89 _{ax}	11.19 _{ax}	8.83 _{ax}				
	AEO ₁	11.34 _{ax}	10.19 _{ax}	10.09 _{ax}	8.86 _{ax}				
mmol AGV total	Control	82.00	137.21	150.97	122.81				
	TAN	99.80	163.16	136.38	109.54				
	AEO ₀₂	84.00	122.43	83.59	106.46				
	AEO ₀₄	97.66	83.97	125.48	122.98	3.15	0.2529	0.0004	0.0001
	AEO ₀₆	132.85 _{ab}	93.43 _a	159.63 _{ab}	188.07 _b				
	AEO ₀₈	146.64	84.74	68.06	168.26				
	AEO ₁	107.31	90.64	82.97	190.90				

^{ab}Los valores con diferentes literales difieren significativamente ($P < 0.05$). ^{x-z}Los valores con diferente literal difieren significativamente ($P < 0.05$). TAN: Dieta base + inclusión de 4% de taninos condensados, AEO₀₂, AEO₀₄, AEO₀₆, AEO₀₈, AEO₁: Dieta base + inclusión de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10% de aceite esencial de orégano, respectivamente; AGV: Ácidos grasos volátiles; EEM: error estándar de la media.

Los valores de N-NH₃ y pH se muestran en la Tabla 4, donde se observa que la concentración de N-NH₃ fue afectada ($P < 0.05$) por el tiempo, aumentado su concentración en todos los tiempos de incubación, pero no debido al tratamiento, sin que se encontraran diferencias por la interacción tratamiento y tiempo. Estos resultados indican que la actividad proteolítica fue adecuada (Cobellis *et al.*, 2016). Los valores de pH no presentaron diferencias ($P > 0.05$) por efecto de tratamiento, tiempo o la interacción de ambos factores.

Algunos estudios muestran resultados diferentes a los obtenidos en el presente estudio, ya que los tratamientos aumentan o disminuyen la concentración de amoníaco. La evaluación *in vitro* con la adición de 30% de *Acacia decurrens* considerada como una fuente de taninos, redujo la concentración de amoníaco a las 24 y 48 h mostrando diferencias ($P < 0.05$) en relación al tratamiento control (Ramírez-Vásquez *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en el presente

estudio no mostraron efecto de los taninos condensados al adicionarlos en 4%, lo que puede atribuirse a factores como la estructura y concentración de los taninos, tipo de planta, madurez y etapa fenológica afectando la bioactividad de los taninos condensados (Pereira *et al.*, 2018). En otro estudio donde se utilizó aceite de anís (500 mg animal/día) obtuvieron una disminución en la producción de NH₃ considerando que el anís disminuye la desaminación (Fandiño *et al.*, 2008). Paraskevakis (2018) encontró que la concentración de NH₃ en el tratamiento testigo fue diferente ($P < 0.05$) al tratamiento con la adición de un hidrodestilado de hojas secas de orégano (*Oreganum vulgare*) con un contenido de aceite esencial de 5.0% (v/m), atribuyendo este efecto a su alto contenido de carvacrol (89%). El pH es un indicador de la actividad fermentativa de las bacterias, ya que se modifica por la producción de AGV, resultado de la fermentación de carbohidratos. Los resultados de pH obtenidos en este estudio coinciden

Tabla 4. Nitrógeno amoniacal y pH a 6, 12, 24 y 48 h de incubación *in vitro* en dietas integrales para ovinos con inclusión de taninos y diferentes dosis de aceites esenciales de orégano

		Tiempo (h)				P<F			
		6	12	24	48	EEM	Trat	Per	Trat*Per
N-NH ₃ (mg/dl)	Control	11.84 ^a	14.31 ^b	27.74 ^c	36.04 ^d				
	TAN	10.50 ^a	13.54 ^b	25.59 ^c	34.86 ^d				
	AEO ₀₂	11.68 ^a	13.31 ^b	25.61 ^c	28.64 ^d				
	AEO ₀₄	12.48 ^a	15.16 ^b	28.57 ^c	30.85 ^d	1.15	0.1131	0.0001	0.5029
	AEO ₀₆	11.53 ^a	15.39 ^b	28.08 ^c	32.37 ^d				
	AEO ₀₈	12.99 ^a	14.73 ^b	25.45 ^c	37.28 ^d				
	AEO ₀₁	12.04 ^a	14.54 ^b	25.50 ^c	35.67 ^d				
pH	Control	6.26	6.29	5.92	6.65				
	TAN	6.53	6.16	6.43	6.31				
	AEO ₀₂	6.17	6.21	6.12	6.28				
	AEO ₀₄	6.33	6.09	6.20	6.06	0.77	0.3209	0.2855	0.3794
	AEO ₀₆	6.19	6.15	6.07	6.16				
	AEO ₀₈	6.43	6.15	6.38	6.53				
	AEO ₀₁	5.81	6.38	5.92	6.07				

^{abcd} Los valores con diferentes literales difieren significativamente ($P < 0.05$). TAN: Dieta base + inclusión de 4% de taninos condensados, AEO₀₂, AEO₀₄, AEO₀₆, AEO₀₈, AEO₀₁: Dieta base + inclusión de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10% de aceite esencial de orégano, respectivamente; CH₄: metano; CO₂: dióxido de carbono; EEM: error estándar de la media.

con los de Ünal Baruh and Kocabağlı (2017) al evaluar la adición de 250 y 500 ppm de AEO kg/MS. Wu *et al.* (2018) encontraron que al incluir aceite esencial de cítricos en concentración de 0.8 ml/l de líquido ruminal, el pH aumentó. En el presente trabajo el aporte de carbohidratos rápidamente fermentables favoreció la reducción del pH con valores menores a los del rango deseable 6.6-7.0 para un mayor crecimiento de microorganismos celulíticos (Ojeda *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La adición de taninos condensados y niveles crecientes de aceite esencial de orégano no disminuyeron la producción *in vitro* de gases totales, metano, dióxido de carbono, nitrógeno amoniacal y producción de ácidos grasos volátiles; asimismo, no influyeron en los valores de pH.

Funding. This research did not receive any specific grant; the authors funded it.

Interest conflict. The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance with ethical standards. All experimental procedures were approved by the Institutional Review Board of Colegio de Postgraduados, according to regulations established by Animal Protection Law enacted by the State of México.

Data availability. Data are available with the corresponding author upon reasonable request.

Author contributions statement (CRediT). **A. Muñoz-Cuautle** - Conceptualization, Investigation, Writing-original draft, **M.E. Ortega-Cerrilla** - Conceptualization, Methodology, Writing-original draft & editing, **J.G. Herrera-Haro** - Formal Analysis, Data Curation, **J.E. Ramírez-Briebesca** - Methodology, Data Curation, **P. Zetina-Córdoba** - Formal Analysis, Writing-original draft, Writing-review & editing.

REFERENCES

- Adejoro, F. A., Hassen, A. and Akanmu, A. M., 2019. Effect of lipid-encapsulated acacia tannin extract on feed intake, nutrient digestibility and methane emission in sheep. *Animals*, 9(11), pp. 863. <https://doi.org/10.3390/ani9110863>
- AOAC., 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (19th ed.). The Association of Official Analytical Chemist; Washington D.C., USA.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), pp. 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Benaouda, M., González, R. M., Molina, T.L. and Castelán, O. O .A., 2017. Estado de la investigación sobre emisiones de metano

- entérico y estrategias de mitigación en América Latina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(4), pp. 965. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.20>
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. and Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), pp. 209–228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Benchaar, C. and Greathead, H., 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp. 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024>
- Bonilla, C. J. A., and Lemus, F. C., 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 3(2), pp. 215–246.
- Chaves, A. V., Stanford, K., Gibson, L. L., McAllister, T. A. and Benchaar, C., 2008. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), pp. 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.016>
- Cobellis, G., Petrozzi, A., Forte, C., Acuti, G., Orrù, M., Marcotullio, M. C., Aquino, A., Nicolini, A., Mazza V. and Trabalza-Marinucci, M., 2015. Evaluation of the effects of mitigation on methane and ammonia production by using *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils on *in vitro* rumen fermentation systems. Sustainability (Switzerland), 7(9), pp. 12856–12869. <https://doi.org/10.3390/su70912856>
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M. and Yu, Z., 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545–546, pp. 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>
- Dämmgen, U., Rösemann, C., Haenel, H. -D. and Hutchings, N. J., 2012. Enteric methane emissions from German dairy cows. *Landbauforschung -vTI Agriculture and Forestry Research*, 1/2(62), pp. 21–32.
- Fandiño, I., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Blanch, M., 2008. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), pp. 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.018>
- García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F. F., Gutiérrez-Urbe, J. A. and García-Lara, S., 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), pp. 339–353. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i2.1467>
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S. and Becker, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3–4), pp. 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A. D. G., Bishop-Hurley, G. and Kalantar-zadeh, K., 2016. Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34(1), pp. 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H. P. S. and Becker, K., 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 209, pp. 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.002>
- Knapp, J. R., Laur, G. L., Vadas, P. A., Weiss, W. P. and Tricarico, J. M., 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97(6), pp. 3231–3261. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
- Makkar, H. P. S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(3), pp. 241–256. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00142-1)
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17(2), pp. 297–304. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90133-7)
- Medjekal, S., Bodas, R., Bousseboua, H. and López, S., 2017. Evaluation of three medicinal plants for methane production potential, fiber

- digestion and rumen fermentation *in vitro*. *Energy Procedia*, 119, pp. 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.089>
- NRC (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants. Nutrient Requirements of Small Ruminants. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11654>
- Ojeda, Á., Reyes, M. and Rodríguez, W., 2012. Efecto de la liberación controlada de nitrógeno sobre la fermentación y la degradabilidad in situ de *Cynodon dactylon*. *Revista MVZ Córdoba*, 17(3), pp. 3133–3139. <https://doi.org/10.21897/rmvz.212>
- Ørskov, E. R. and McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 92:(1970), pp. 499–503.
- Ortiz, D. M., Posada, S. L. and Noguera, R. R., 2014. Effect of plant secondary metabolites on methane enteric emission in ruminants [Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes]. *Livestock Research for Rural Development*, 26(11).
- Paraskevakis, N., 2018. Effects of dietary Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) supplementation on rumen fermentation, enzyme profile and microbial communities in goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(3), pp. 701–705. <https://doi.org/10.1111/jpn.12812>
- Pereira, T. P., Modesto, E. C., Nepomuceno, D. de D., de Oliveira, O. F., de Freitas, R. S. X., Muir, J. P., Dubeux Jr, J. C. B. and Almeida, J. C. de C., 2018. Characterization and biological activity of condensed tannins from tropical forage legumes. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 53(9), pp. 1070–1077. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000900011>
- Polin, L. A., Muro, A. and Díaz, L. H., 2014. Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes. Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 5(1), pp. 25–47.
- Prieto-Manrique, E., Vargas-Sánchez, J. E., Angulo-Arizala, J. and Mahecha-Ledesma, L., 2017. Aceites vegetales sobre ácidos grasos y producción de metano *in vitro* en vacas lecheras. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), pp. 1–18. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22034>
- Ramírez-Vásquez, R., Cuesta-Peralta, A., Cortés, J. E., 2017. Efecto in vitro de la inclusión de *Acacia decurrens* y *Sambucus nigra* sobre la utilización del nitrógeno en rumiantes. *Zoociencia* 2, pp. 3–4.
- SAS., 2018. Statistical Analytical Systems, User's Guide 15.1, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA 2012.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. and France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48, pp. 185–197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Tekeli, A., Yıldız, G., Drochner, W. and Steingass, H., 2017. Effects of essence oil additives added to different feeds on methane production Efectos sobre la producción de metano de los aceites esencias añadiendo diferentes aditivos. *Revista MVZ Córdoba*, 22(2), pp. 5854–5866. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1023>
- Ünal Baruh, A. and Kocabağlı, N., 2017. Effect of different levels of oregano essential oil on some rumen parameters in lambs. *Istanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43(2), pp. 116–122. <https://doi.org/10.16988/iuvfd.322369>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., and Lewis, B. A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), pp. 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wu, P., Liu, Z. B., He, W. F., Yu, S. B., Gao, G. and Wang, J. K., 2018. Intermittent feeding of citrus essential oils as a potential strategy to decrease methane production by reducing microbial adaptation. *Journal of Cleaner Production*, 194, pp. 704–713. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.167>