



Fermentación ruminal *in vitro* de una dieta para ovinos al variar origen y dosis de aceite esencial de orégano †

[*In vitro* ruminal fermentation of a diet for lambs by varying origin and dose of oregano essential oil]

Alvin Gustavo Carrillo-Hurtado¹, Luis Alberto Miranda-Romero¹,
Noé Galindo-Dorantes¹, Jorge Ramsy Kawas-Garza²,
Gerardo Mendez-Zamora³, Daniela Saraí Rico-Costilla²,
Yarellys Ramos-Zayas² and Maximino Huerta-Bravo^{1*}

¹Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia. Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo CP. 56230 Estado de México, México. Email:

alvin_cahu@hotmail.com, microbiologia.pecuaria08@gmail.com,
galindodn@gmail.com, maximino_h@hotmail.com

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Francisco Villa S/N, Ex Hacienda El Canadá, CP. 66050. Escobedo, Nuevo León, México. Email: jorge.kawas@mnademexico.com,
daniela_rico@msn.com, yareellysraza@hotmail.com,

³Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. Francisco Villa S/N, Ex Hacienda El Canadá, CP. 66050. Escobedo, Nuevo León, México.

Email: mezage@hotmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background: Oregano essential oil (OEO) is a natural alternative to conventional additives. OEO can improve efficiency in ruminant diets, but the magnitude of the impact may vary according to the origin and dose applied. **Objective:** To analyze the *in vitro* ruminal fermentation pattern by changing the origin and dose of OEO. **Methodology:** The treatments had a 2*5+1 factorial arrangement, the factors were the origin: Mexican (MOEO) and European (EOEO), and the dose: at levels of 70, 140, 280, 560, and 1120 ppm of the wet base substrate plus a control without addition of OEO. Contrasts and orthogonal polynomials were used to compare means. The variables quantified were: fast (FRF), medium (FMF) and slow fermentation fractions, as well as their total fermentable fraction (FTF); *in vitro* degradability of dry matter at 24 h (IVDMD24) and 72 h (IVDMD72); the *in vitro* degradability of organic matter at 72 h (IVOMD72); lag phase (L); fermentation rate (S); maximum volume (mV); VFA and CH₄ production; acetic/propionic ratio (A/P); global warming potential index (GWPI) and environmental impact indicator (EII). **Results.** MOEO linearly affects FMF FTF, and Vm as the dose increases, while AEOE is a quadratic trend hence, MOEO is different from the control. IVOMD72 tends to decrease as the dose of the two OEOs increases; increasing the inclusion of MOEO decreases A/P linearly; EOEO and MOEO are different from the control in VFA production. There were no effects on environmental impact variables. **Implications.** The components of MOEO have greater antimicrobial capacity against rumen bacteria than AEOE, MOEO could act similarly to the impact of feed additives such as ionophores in reducing A/P. **Conclusion.** MOEO can better modulate ruminal fermentation than EOEO but decreases digestion and total gas production more.

Key words: Oregano essential oil; rumen fermentation; sheep.

RESUMEN

Antecedentes: El aceite esencial de orégano (AEO) es una alternativa natural a los aditivos convencionales. El AEO puede mejorar la eficiencia en dietas de rumiantes, la magnitud del impacto puede variar según el origen y la dosis aplicada. **Objetivo:** Analizar el patrón de fermentación ruminal *in vitro* al variar el origen y dosis del AEO.

† Submitted February 17, 2025 – Accepted July 21, 2025. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6198>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = A.G. Carrillo-Hurtado: <http://orcid.org/0000-0002-6882-6517>; L.A. Miranda-Romero: <http://orcid.org/0000-0003-0342-7897>; N. Galindo-Dorantes: <http://orcid.org/0000-0002-2559-6141>; J.R. Kawas-Garza: <http://orcid.org/0000-0003-3543-4506>; G. Mendez-Zamora: <http://orcid.org/0000-0002-1428-5217>; D.S. Rico-Costilla: <http://orcid.org/0000-0002-5508-8914>; Y. Ramos-Zayas: <http://orcid.org/0000-0003-0007-3851>; M. Huerta-Bravo: <http://orcid.org/0000-0002-9150-8971>

Metodología: Los tratamientos tuvieron un arreglo factorial $2 \times 5 + 1$, los factores fueron el origen: mexicano (AEOM); y europeo, (AEOE) y la dosis: en niveles de 70, 140, 280, 560 y 1120 ppm del sustrato base húmeda más un testigo sin adición de AEO. Se utilizaron contrastes y polinomios ortogonales para la comparación de las medias. Las variables cuantificadas fueron: fracciones de rápida (FRF), mediana (FMF) y lenta fermentación, así como su fracción fermentable total (FFT); degradabilidad *in vitro* de la materia seca a las 24 h (DIVMS24) y 72 h (DIVMS72); la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica a las 72 h (DIVMO72); Fase lag (L); tasa de fermentación (S); volumen máximo (Vm); producción de AGV's y de CH₄; relación acético/propiónico (A/P); índice potencial de calentamiento global (IPCG) e indicador de impacto ambiental (IIA). **Resultados.** El AEOM afecta linealmente la FMF, FTF y Vm conforme se incrementa la dosis, mientras que el AEOE es una tendencia cuadrática por ello AEOM es diferente al control. La DIVMO72 tiende a disminuir conforme se incrementa la dosis de los dos AEO; el aumento de la inclusión de AEOM disminuye A/P de marea lineal; AEOE y AEOM son diferentes al testigo en la producción de AGV's. No se presentaron efectos en las variables de impacto ambiental. **Implicaciones.** Los componentes del AEOM tienen mayor capacidad antimicrobiana contra las bacterias del rumen que el AEOE, el AEOM podría actuar de manera similar a los efectos de los aditivos alimenticios como los ionóforos al reducir A/P. **Conclusión.** El AEOM puede modular de mejor manera de la fermentación ruminal que el AEOE, pero disminuye más la digestión y la producción de gas total.

Palabras clave: Aceite esencial de orégano; fermentación ruminal; Ovinos.

INTRODUCCIÓN

El aceite esencial de orégano (AEO) es un aditivo fitogénico de los más divulgados como una alternativa natural a los aditivos convencionales prohibidos para su uso comercial, como es el caso de la Unión Europea (Benchaar *et al.*, 2008; Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2017). Sus componentes son carvacrol, γ -terpineno, timol, p-cimeno y linalol, y la concentración de estos puede variar según el origen y el tipo de AEO (Sivropoulou *et al.*, 1996; Baser, 2002). La información sobre el uso del AEO en la producción animal, particularmente en rumiantes, es limitada en comparación con su uso en la engorda de pollos, donde existen estudios que sugieren beneficios (Ghazi *et al.*, 2015; Méndez-Zamora *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2016; Reyer *et al.*, 2017; Silva-Vázquez *et al.*, 2018; Skoufos *et al.*, 2016).

El AEO como aditivo en dietas de rumiantes puede aumentar la eficiencia al incrementar la digestibilidad y reducir la liberación de metano, importante gas de efecto invernadero (Cobellins *et al.*, 2016; FAO 2010). El impacto del AEO mencionado es a través de modificar el patrón de fermentación ruminal por actividad antioxidante y antimicrobiana asociada a los componentes timol y carvacrol encontrado en él (Calvo-Irabien, 2018; Piñon *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2008).

El estudio de la fermentación ruminal puede hacerse en condiciones *in vitro* ya que ahorra recursos, a la vez que permite prever lo que podría suceder *in vivo* (Danielsson *et al.*, 2017). La magnitud del efecto del AEO en el patrón de fermentación ruminal puede variar con el origen del orégano (Mata-González y Meléndez-González, 2005). A la par del origen, la dosis aplicada a la dieta también se ha identificado como una posible fuente de variación en la magnitud

de la respuesta de la fermentación ruminal (Castillejos *et al.*, 2008), por lo que conviene estudiar el impacto de estos dos factores. El objetivo del estudio fue analizar el patrón de fermentación ruminal *in vitro* al variar el origen y dosis del AEO, para generar información que acredite el uso del AEO como aditivo fitogénico en dietas por rumiantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de fermentación ruminal *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria, del Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo y en el Laboratorio de Nutrición y Metabolismo Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Diseño experimental y tratamientos

Se utilizó un diseño factorial con dos factores: origen de AEO (dos niveles) y dosis de adición (cinco niveles:), también se tuvo un testigo sin adición de AEO. El origen de AEO fue: orégano mexicano, *Lippia berlandieri* Schauer (AEOM); y europeo, *Origanum vulgare* (AEOE) y las dosis fueron: 70, 140, 280, 560 y 1120 ppm del sustrato base húmeda. La composición de cada uno de los AEO se presenta en la tabla 1. El diseño experimental fue completamente al azar con 6 repeticiones, considerando como unidad experimental un vial de 125 mL.

Obtención de líquido ruminal

La extracción de líquido ruminal se realizó siguiendo la norma nacional mexicana sobre uso animal (NOM-062-ZOO, 1999). Se obtuvo contenido ruminal de tres ovinos adultos hembra mediante sonda esofágica, que consumían 2.5 kg por día de alimento concentrado

formulado para la engorda intensiva de corderos de acuerdo con las especificaciones del NASEM (2007) que contenía 16% de PC y 3.0 Mcal kg⁻¹ de EM. El alimento se ofreció dos veces al día (7:30 y 15:00 h). Los ovinos se adaptaron a la dieta por 8 d previos a la primera toma de inóculo para las pruebas de fermentación *in vitro*. La toma de inóculo ruminal (aproximadamente 0.900 L) se realizó en la mañana 2:00 h postprandial, inmediatamente después de su colección se filtró a través de 8 capas de tela de gasa (grado 50).

Tabla 1. Componentes activos de los AEO utilizados.

Componente	AEOM (%)	AEOE (%)
Beta.-Mirceno	0.59	5.54
Alfa-Terpineno	0.68	6.25
p-Cimeno	14.10	6.51
Eucaliptol	0.14	
Gamma-terpineno	2.69	7.42
Linalol	0.16	
4-Terpineol	0.32	11.60
Metil timil éter	0.16	
Thimol	4.65	16.52
Carvacrol	67.94	17.37
Eugenol	0.23	
Acetato de timol	0.24	
Cariofileno	2.13	
Alfa Cariofileno	1.46	24.13
Beta-bisaboleno	0.23	
Óxido de cariofileno	0.96	

AEOM: Aceite esencial de orégano mexicano.

AEOE: Aceite esencial de orégano europeo.

Producción de gas *in vitro*

La fermentación *in vitro* se realizó mediante la técnica de producción de gas siguiendo las directrices generales de Menke y Steingass (1988). Se hicieron dos corridas cada una con 72 viales. Se colocaron 500 mg del mismo alimento concentrado que consumieron las donadoras de inóculo en frascos ámbar de 125 mL de capacidad y se les añadieron simultáneamente, un flujo continuo de bióxido de carbono y 90 mL de inóculo ruminal diluido 1:9 con una solución mineral constituida de 680 mL de H₂O, 75 mL de solución A (6.0 g K₂HPO₄ por L de H₂O), 75 mL de solución B (6.0 g KH₂PO₄, 6.0 g (NH₄)₂SO₄, 12 g de NaCl, 2.45 g de MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂·2H₂O por L de H₂O), 50 mL de solución C (80 g de Na₂CO₃ por L de H₂O) y 20 mL de solución reducida (2.5 g de cisteína, 15 mL de NaOH (2 N), 2.5 g de Na₂S y 0.1 mL de (resazurina 1% por 100 mL). Posteriormente los frascos se mantuvieron bajo un flujo constante de CO₂ y se sellaron herméticamente con un tapón de goma y un anillo de aluminio como lo describen Theodorou *et al.*

(1994) y se colocaron en un baño de agua a 39 °C. El proceso de fermentación *in vitro* se realizó a dos tiempos de incubación 24 y 72 h, al término de cada uno la muestra se filtró para obtener el residuo no digerido.

Variabes medidas y calculadas

Durante el proceso de la fermentación *in vitro* a las 72 h, se determinó la presión de gas con un manómetro (Metron, modelo: 63100, México) a 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h de incubación (Blümmel y Lebzien 2001).

En el caso del proceso de la fermentación *in vitro* a las 24 h se determinó el volumen total de gas de fermentación, se midió con una jeringa de vidrio de 50 mL de capacidad, a las 6, 12, 18 y 24 h de incubación. En cada medición y después de registrar el volumen, el gas atrapado en la jeringa se transfirió a frascos de vidrio (125 mL de capacidad) herméticamente cerrados, los cuales tenían 45 mL de una solución 1M de hidróxido de potasio (KOH) se mezcló perfectamente el gas con la solución de KOH con el fin de hacer reaccionar todo el CO₂ con el KOH. El volumen de gas residual que retorna a la jeringa después de la mezcla corresponderá al volumen de metano más gases menores (Figura 1).

Al final de este periodo de incubación de 24 h y antes de filtrar para medir digestibilidad, se depositó 4.0 mL de líquido ruminal en tubos de plástico con 1.0 mL de ácido meta-fosfórico, el cual detuvo el proceso de fermentación. Los tubos se congelaron y almacenaron a 20 °C hasta el momento del análisis. La cantidad de material residual de la muestra en fermentación se pesó a 24 y 72 h de incubación este peso fue luego de un secado a 60 °C durante 48 h.

Con base a las determinaciones de fermentación y presión de gas se calculó: fracciones de fermentación (mg g⁻¹ de alimento) rápida (FFR), media (FFM), lenta (FFL) y total (FFT); porcentaje de degradabilidad *in vitro* a 24 y 72 h (DIVMS24 y DIVMS72), y de degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica a 72 h (DIVMO72); Volumen (V, mLg⁻¹MS); volumen máximo (Vm, mL g⁻¹), velocidad de fermentación (S, h⁻¹) y fase de retraso (L, h); proporción de ácidos grasos volátiles acético, propiónico y butírico (mmol 100mol⁻¹) y la relación acético:propiónico (A/P); metano (CH₄, %) indicador potencial de calentamiento global (IPCG, CO₂ eq MS⁻¹) e índice de impacto ambiental (IIA).

Fracciones de fermentación. Se obtuvieron volúmenes fraccionales de gas acumulado para los intervalos de 0 a 8 h (Vf0–8), 8 a 24 h (Vf8–24) y 24 a 72 h (Vf24–72) de incubación. Los volúmenes resultantes se

usaron para estimar las fracciones de fermentación FFR, FFM y FFL de cada tratamiento de acuerdo con las ecuaciones de regresión lineal propuestas por Miranda *et al.* (2015):

$$\text{FFR} = \text{Vf0-8} / 0.4266$$

$$\text{FFM} = \text{Vf8-24} / 0.6152$$

$$\text{FFL} = \text{Vf24-72} / 0.3453$$

Donde:

Vf0-8 = volumen de gas producido de 0 a 8 h de fermentación;

Vf8-24 = volumen de gas producido de 8 a 24 h de fermentación;

Vf24-72 = volumen de gas producido de 24 a 72 h de fermentación.

La suma de las tres fracciones será FFT.

Degradabilidad *in vitro*

Al final de cada período de incubación (24 y 72 h), se obtuvieron los residuos de cada muestra utilizando un embudo Buchner con filtro (papel de filtro). La degradabilidad *in vitro* de la MS se estimó secando el material residual a 60 °C durante 48.0 h, y su porcentaje se calculó con base en la MS inicial y residual a las 24 h (DIVMS24) y 72 h (DIVMS72). La degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica (MO) se estimó incinerando el material residual a 500 °C, y el porcentaje se calculó a partir de la MO inicial y residual solamente a las 72 h (DIVMO72) (Monforte-Briceño *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2015).

Cinética de fermentación

Los valores de presión de gas (kg cm^{-3}) se transformaron a volumen (mLg^{-1}MS) de gas mediante

la siguiente ecuación de regresión lineal: $V = (P + 0.0186) (0.0237)^{-1}$ (Elmasry *et al.*, 2016), donde V = volumen de gas producido y P = presión generada en cada frasco. Los datos del volumen de gas se utilizaron para obtener los parámetros de la cinética de producción de gas, mediante el procedimiento de análisis no lineal (NLIN) de SAS (SAS, 2021) mediante el uso del modelo logístico $V = V_m / (1 + e^{-(S-L)t})$ (Schofield y Pell, 1995), donde V = volumen de gas a lo largo del tiempo (t), V_m = volumen máximo de gas correspondiente a la digestión del sustrato (asíntota), S = velocidad de fermentación, similar a la velocidad de degradación, y L = tiempo requerido para que los microorganismos colonicen el sustrato.

Ácidos grasos volátiles

La proporción de AGV's se midió por la técnica de cromatografía de gases en un cromatógrafo modelo Star 3400 Cx (Varian®, Palo Alto, CA, Estados Unidos), equipado con una columna ZB- WAX de 30 m \times 0.53 mm \times 0.5 μm (Phenomenex®, Torrance, CA, Estados Unidos) utilizando nitrógeno como gas de arrastre y un detector de tipo FID (detector de ionización de flama). Para determinar los AGV se calibró el equipo mediante las especificaciones del fabricante. Al momento del análisis las muestras se descongelaron, éstas antes de inyectarse al cromatógrafo se les preparó mediante una decantación del líquido ruminal en tubos de 5 mL (Vacutainer™, Becton Dickinson and Company®, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) los cuales se centrifugaron a 10,000 g por 10 min en una centrifuga modelo Universal 320R (Hettich zentrifugen®, Tuttlingen, Alemania), después con una jeringa Hamilton se inyectaron en el cromatógrafo de gases.

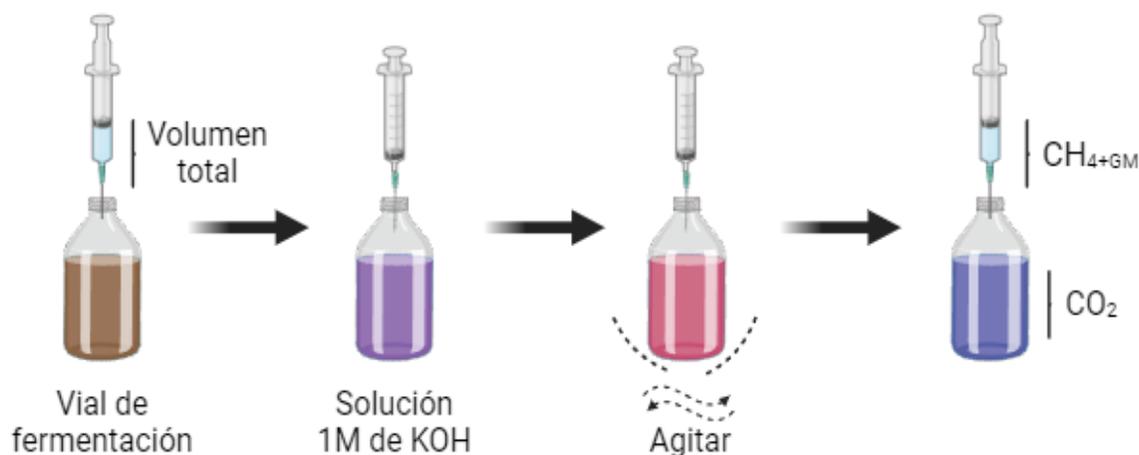


Figura 1. Método para obtener Metano más gases menores ($\text{CH}_4 + \text{GM}$).

El volumen inyectado del líquido al cromatógrafo fue de 1 μ L, la temperatura del inyector y detector fue 250°C, mientras que para la columna primero se realizó un calentamiento a 90°C durante 2 minutos para después aumentar 20°C/minuto hasta llegar a una temperatura final de 200°C y estabilizarse durante 3 minutos. El software utilizado para el manejo del equipo, así como para la lectura de los cromatogramas fue el Software Control \pm Varian Star 3400cx (Varian® Palo Alto, California, Estados Unidos).

VARIABLES DE IMPACTO AMBIENTAL

El volumen de CH₄+GM se ajustó a metano teórico (CH₄) multiplicando por 0.77 cada valor de CH₄+GM (Zhong *et al.*, 2016). Con los valores de CO₂ y CH₄ se obtuvo el IPCG, considerando un valor equivalente por metano de 23 (Berra *et al.*, 2009) y la siguiente ecuación: IPCG (mL CO₂ eq g⁻¹ MS) = CO₂ (mL g⁻¹) + CH₄ (mL g⁻¹) \times 23. El IIA correspondió a la relación del IPCG y el VTGF, de acuerdo con la ecuación: IIA (CO₂ eq MS⁻¹) = (IPCG / VTGF).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las variables se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento del modelo lineal general GLM de SAS (SAS, 2021).

Para definir la tendencia de respuesta a los niveles de adición (dosis) se recurrió al análisis de los contrastes de polinomios ortogonales para determinar el efecto lineal, cuadrático o cúbico; este análisis se hizo para cada tipo (origen) de orégano y su comparación entre ellos. En este análisis se corrigió el coeficiente de contraste de polinomio ortogonal, debido a que las dosis no son equidistantes, a través del procedimiento IML de SAS (SAS, 2021).

Para el análisis estadístico se utilizó el modelo correspondiente al diseño experimental utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + D_j + P_k + (\tau \times D)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = variable respuesta,

μ = media general de todos los datos experimentales,

τ_i = efecto asociado con el tipo de AEO

D_j = efecto asociado con la dosis (nivel)

P_k = experimento repetido en el tiempo

$(\tau \times D)_{ij}$ = es el efecto de la interacción de primer orden entre el tipo de AEO y la dosis (nivel)

ϵ_{ijk} = error aleatorio asociado con cada medición de la variable de respuesta, se asumió $e_i \sim NIID(0, \sigma_e^2)$.

i = AEOM, AEOE

j = 0, 70, 140, 280, 560, 1120

k = 1, 2

RESULTADOS

Fraciones de fermentación y degradabilidad *in vitro*

Todas las fracciones tuvieron efectos importantes (Tabla 2), la FFR, FFM y la FFT fueron afectadas por los factores de tipo de origen ($P < 0.01$), la dosis ($P \leq 0.01$) y la interacción de origen por dosis. La FFR mostró una tendencia cúbica en los dos orígenes de AEO, aunque en el AEOE fue altamente significativa ($P < 0.01$) mientras que en el mexicano fue significativa ($P < 0.05$). El AEOE, mostró su valor más alto en la dosis de 560 ppm aunque fue numéricamente mayor, la diferencia con el control no fue significativa de acuerdo con la prueba de comparación por contrastes ortogonales ($P > 0.05$); mientras que la diferencia entre AEOM y AEOE si lo fue ($P < 0.01$), siendo mayor AEOE.

Para el caso de la FFM se observó una tendencia lineal significativa ($P < 0.01$) con AEOM obteniéndose el mayor resultado con la dosis de 1,120 ppm mientras que con AEOE fueron significativas ($P < 0.05$) las tendencias lineal y cúbica, así como la tendencia cuadrática ($P < 0.01$) siendo mayor la dosis de 560 ppm, en los contrastes los orígenes de AEO son diferentes entre si ($P < 0.01$), el AEOM es diferente al control ($P < 0.01$) y el AEOE no tuvo diferencia con el control ($P > 0.05$). La FFL solo se presentó un efecto cuadrático significativo ($P < 0.05$) cuando se añadió AEOE. La FFT tuvo una tendencia lineal para AEOM ($P < 0.05$) y cuadrática para AEOE ($P < 0.05$), al igual que en los casos anteriores, la dosis que presentó los resultados mayores fue la de 1120 en AEOM y la de 560 en AEOE. El AEOM fue diferente al control ($P < 0.05$), mientras que AEOE y el control son iguales ($P > 0.05$).

La DIVMS24 muestra efectos de la interacción de los factores (Tabla 3), ya que el AEOM tiene un efecto inhibitor más marcado en la menor dosis, aunque alcanza mayor degradabilidad con forme esta se incrementa, por lo que presenta una tendencia lineal marcada ($P < 0.01$) mientras que el AEOE no presentó efectos. El tiempo parece influenciar ya que para el caso de DIVMS72 el AEOE obtuvo su menor degradabilidad en las dosis más altas con una tendencia polinomial lineal altamente significativa ($P < 0.01$). Este comportamiento fue similar para DIVMO72 y para AEOM que también mostró una tendencia lineal ($P < 0.01$) al disminuir la degradabilidad conforme se aumentaba la dosis.

Tabla 2. Fracciones de fermentación *in vitro* con la adición de AEO de diferente origen y a diferentes dosis¹.

Origen	Dosis (ppm)	FRF (g kg ⁻¹)	FMF (g kg ⁻¹)	FLF (g kg ⁻¹)	FFT (g kg ⁻¹)
Sin AEO	0	282.98	231.68	263.00	777.66
	DEM	±47.38	±20.37	±32.43	±57.50
AEOM	70	278.39	187.77	244.60	710.77
	140	233.66	174.70	248.18	656.55
	280	239.49	192.04	273.71	705.24
	560	247.26	195.77	268.32	711.35
	1120	253.98	230.13	281.31	765.42
	DEM	±32.90	±27.24	±44.01	±63.63
	Efecto	C*	L**	NS	L**
AEOE	70	268.40	199.57	241.15	709.12
	140	298.48	215.91	251.45	765.84
	280	240.61	206.76	286.76	734.14
	560	295.76	252.43	294.74	842.93
	1120	262.28	221.91	249.03	733.21
	DEM	±35.05	±29.09	±46.61	±76.75
	Efecto	C**	L* Q**C*	Q**	Q**
<i>Nivel de significancia</i>	Origen	<0.001	<0.001	0.892	0.002
	Dosis	0.001	<0.001	0.119	0.010
	Origen*Dosis	<0.001	<0.001	0.465	0.002
Contraste	AEOE vs AEOM	<0.001	<0.001	0.892	0.002
	AEOM vs Sin AEO	0.011	<0.001	<0.001	0.007
	AEOE vs Sin AEO	0.162	0.119	0.927	0.423

¹AEO= Aceite esencial de orégano, AEOM= Aceite esencial de orégano mexicano, AEOE= Aceite esencial de orégano europeo. FRF= Fracción de rápida fermentación FMF=Fracción de mediana fermentación, FLF= Fracción de lenta fermentación, FFT= Fracción fermentable total. Efectos significativos de los polinomios ortogonales (** P 0.01; *P 0.05) lineales (L), cuadráticos (Q) y cúbicos (C). NS, no significativo.

Tabla 3. Degradabilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica con la adición de AEO de diferente origen y a diferentes dosis¹.

Origen	Dosis (ppm)	DIVMS24 (%)	DIVMS72 (%)	DIVMO72 (%)
Sin AEO	0	70.75	83.38	94.48
	DEM	2.41	0.62	0.03
AEOM	70	64.78	85.57	95.67
	140	72.60	85.35	95.48
	280	75.13	85.73	95.46
	560	72.30	82.34	92.52
	1120	73.32	82.80	92.91
	DEM	3.94	2.33	2.33
	Efecto	L**C**Q**	NS	L**
AEOE	70	73.94	83.56	93.60
	140	75.30	84.19	94.24
	280	74.61	85.37	95.17
	560	69.73	84.89	95.24
	1120	72.50	79.10	89.97
	DEM	2.72	2.91	2.66
	Efecto	NS	L**Q*	L*Q*
<i>Nivel de significancia</i>	Origen	0.036	0.211	0.312
	Dosis	<0.001	0.011	0.043
	Origen*Dosis	<0.001	0.127	0.178
Contraste	AEOE vs AEOM	0.036	0.211	0.312
	AEOM vs Sin AEO	0.458	0.437	0.955
	AEOE vs Sin AEO	0.098	0.975	0.498

¹AEO= aceite esencial de orégano, AEOM= aceite esencial de orégano mexicano, AEOE= aceite esencial de orégano europeo. DIVMS24= degradabilidad *in vitro* de la materia seca a las 24 h, DIVMS72= degradabilidad *in vitro* de la materia seca a las 72 h, DIVMO72= degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica a las 72 h. Efectos significativos de los polinomios ortogonales (** P<0.01; *P<0.05) lineales (L), cuadráticos (Q) y cúbicos (C). NS, no significativo.

Cinética de fermentación y producción de AGV's

No se encontraron efectos significativos ($P>0.052$) del AEOM ni del AEOE en sus diferentes dosis en L y S (Tabla 4), pero hubo algunos efectos importantes en Vm. Tanto el origen como la dosis y su interacción fueron significativos ($P<0.01$).

El AEOM mostró una tendencia lineal ($P<0.01$) en incrementar el volumen de gas conforme se aumenta la dosis, el registro más bajo se presentó con la dosis de 140 ppm y el más alto con la dosis de 1120, aunque este resultado sigue siendo inferior al control, por lo cual el Vm de AEOM es significativo cuando se contrasta con el control ($P<0.01$), al igual que cuando se compara con el AEOE ($P<0.01$) ya que los resultados de AEOM siguen siendo bajos a pesar de que aumenta el volumen conforme aumenta la dosis. El AEOE, a diferencia del AEOM, mostró una tendencia cuadrática ($P<0.01$) con respecto a la dosis, pero el AEOE no fue diferente del control, pero numéricamente la dosis de 560 ppm fue la mayor.

En la tabla 5 se muestra la producción de AGV's no fue afectada por el origen de AEO ($P>0.05$), pero si

por la dosis ($P<0.05$) mientras que su interacción (origen×dosis) afectó la concentración de ácido acético ($P>0.05$), que, aunque los dos orígenes muestran una tendencia lineal altamente significativa ($P<0.01$), el AEOM suprime la producción de este ácido graso de cadena corta conforme se incrementa la dosis, mientras que AEOE aumenta su concentración paralelamente con el incremento en dosis. La interacción de los factores también afectó la producción de ácido butírico, el AEOM mostró un comportamiento cuadrático ($P<0.01$) alcanzando mayores niveles en las dosis intermedias, mientras que el AEOE suprimió la producción conforme se aumentaba la dosis, por lo que su polinomio ortogonal lineal es altamente significativo ($P<0.01$).

El AEOM aumentó la producción de ácido propiónico conforme se incrementó la dosis de una manera lineal ($P<0.05$), mientras que AEOE no tuvo ninguna influencia en este ácido graso volátil. El efecto en los ácidos acético y propiónico por parte del AEOM se reflejó en su relación, que se comportó de una manera lineal altamente significativa ($P<0.01$) a reducirse, mientras que para AEOE no hubo efecto en esta relación.

Tabla 4. Variables de cinética de producción de gas *in vitro* con la adición de AEO de diferente origen y a diferentes dosis¹.

Origen	Dosis (ppm)	L (h)	S (h ⁻¹)	Vm (mL g ⁻¹)
Sin AEO	0	2.082	0.0359	334.90
	DEM	±0.858	±0.0013	±18.10
AEOM	70	2.410	0.0350	298.98
	140	2.910	0.0332	275.45
	280	2.295	0.0334	296.67
	560	2.183	0.0335	299.05
	1120	2.582	0.0351	327.87
	DEM	±1.077	±0.0035	±26.54
	Efecto	NS	NS	L**
AEOE	70	2.941	0.0360	301.37
	140	1.841	0.0367	326.60
	280	2.248	0.0329	310.48
	560	2.459	0.0356	362.32
	1120	2.406	0.0366	316.70
	DEM	±1.136	±0.0038	±31.41
	Efecto	NS	NS	Q**
Nivel de significancia	Origen	0.740	0.052	<0.001
	Dosis	0.912	0.250	<0.001
	Origen*Dosis	0.487	0.563	<0.001
Contraste	AEOE vs AEOM	0.740	0.052	<0.001
	AEOM vs Sin AEO	0.432	0.146	<0.001
	AEOE vs Sin AEO	0.562	0.796	0.283

¹AEO= Aceite esencial de orégano, AEOM= Aceite esencial de orégano mexicano, AEOE= Aceite esencial de orégano europeo. Vm= Volumen máximo, S= Taza de fermentación, L= Fase Lag. Efectos significativos de los polinomios ortogonales (** P 0.01; *P 0.05) lineales (L), cuadráticos (Q) y cúbicos (C). NS, no significativo.

No hubo diferencia entre el AEOM y el AEOE, pero marcan diferencia en el testigo según los contrastes ($P < 0.05$), el acético es menor, el propiónico aumenta al igual que el butírico mientras que la relación A/P disminuye cuando se adiciona AEO de origen mexicano o europeo.

Indicadores de impacto ambiental

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en las variables de impacto ambiental ($P > 0.05$), no hubo tendencias de los polinomios, ni los contrastes tuvieron algún efecto, así como la significancia de los factores. Los mayores valores se presentaron con la dosis de mayor inclusión de 1,120 para los 2 tipos de AEO, mientras que el menor registro se obtuvo con 140 ppm.

DISCUSIÓN

Fracciones de fermentación y degradabilidad *in vitro*

La fermentación entre intervalos de tiempo es un indicador directo de las diferencias en el contenido de

polisacáridos, proteínas y fibras (Guo *et al.*, 2008), que se pueden expresar como fracciones fermentables (Miranda *et al.*, 2015). En el presente estudio, en ambos orígenes FFR tuvo un comportamiento cúbico significativo (Tabla 2), lo que sugiere que la dosis interactúa con la fermentación de los carbohidratos solubles, así como azúcares simples, monosacáridos y algunos aminoácidos (Hartmann, 2007). Este inicio rápido a moderado del proceso de fermentación (Tabla 2) puede deberse a una fermentación adicional de su fracción soluble que contiene azúcares simples (Miranda *et al.*, 2015).

El comportamiento lineal de AEOM en FFM muestra que la dosis más alta puede estar facilitando la digestión del almidón y por consiguiente un aumento la FFT, mientras el AEOE mantuvo un comportamiento cuadrático altamente significativo estadísticamente ($P < 0.002$). Esto podría aseverar que la dosis de 1,120 en AEOM promueve mayor sincronía entre la digestión de azúcares simples, almidón, pectinas y para el caso AEOE también la celulosa y hemicelulosa lo que aumenta la cantidad fermentada a los diferentes niveles (Albores-Moreno *et al.*, 2018).

Tabla 5. Concentración molar de ácidos grasos volátiles *in vitro* con la adición de AEO de diferente origen y a diferentes dosis¹.

Origen	Dosis (ppm)	Acético (mol 100 mol ⁻¹)	Propiónico (mol 100 mol ⁻¹)	Butírico (mol 100 mol ⁻¹)	A/P
Sin AEO	0	58.95	28.95	12.10	2.05
	DEM	2.96	2.37	0.63	0.27
AEOM	70	53.43	33.70	12.87	1.59
	140	52.75	33.64	13.61	1.57
	280	51.92	33.87	14.21	1.54
	560	51.12	34.52	14.37	1.48
	1120	50.48	35.67	13.85	1.42
	DEM	1.38	1.17	0.66	0.09
	Efecto		L**	L*	Q**
AEOE	70	51.80	34.12	14.07	1.52
	140	50.91	34.52	14.57	1.48
	280	50.90	35.09	14.01	1.45
	560	54.05	33.17	12.78	1.63
	1120	54.31	33.79	11.91	1.62
	DEM	2.02	1.51	1.24	0.12
	Efecto		L**	NS	L**
<i>Nivel de significancia</i>	Origen	0.419	0.792	0.220	0.629
	Dosis	<0.001	<0.001	0.002	<0.001
	Origen*Dosis	0.006	0.288	<0.001	0.121
Contraste	AEOE vs AEOM	0.419	0.792	0.220	0.629
	AEOM vs Sin AEO	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	AEOE vs Sin AEO	0.001	<0.001	0.022	<0.001

¹AEO= Aceite esencial de orégano, AEOM= Aceite esencial de orégano mexicano, AEOE= Aceite esencial de orégano europeo. A/P= Relación acético propiónico. Efectos significativos de los polinomios ortogonales (** P 0.01; *P 0.05) lineales (L), cuadráticos (Q) y cúbicos (C). NS, no significativo.

El AEOM puede causar un cambio en la población microbiana del rumen que resulta en un perfil de fermentación que beneficiará la producción de rumiantes con dietas altas en concentrado. Cardozo *et al.* (2005) encontraron resultados similares, aunque estos autores reportan que a una dosis alta la fermentación se limita. Una hipótesis pudiera ser que los componentes del AEOM tiene mayor capacidad antimicrobiana con las bacterias del rumen principalmente el carvacrol que es el que se encuentra en mayor cantidad, y es conocido por su fuerte actividad antimicrobiana (Macheboeuf *et al.*, 2008). Con dosis bajas las poblaciones de Gram negativas y Gram positivas pueden ser disminuidas por igual, pero al momento de encontrarse mayor presencia de AEOM podría actuar mayormente contra las bacterias gram positivas y considerando que se alteró la fermentación del almidón (Tabla 2; FFM) es para que exista presencia de gram positivas, por lo que el aumento en la dosis mejoró la fermentación linealmente.

En cuanto al AEOE los resultados del presente estudio coinciden con los reportados por Castillejos *et al.* (2008). Estos autores, también con una dieta alta en concentrado, encontraron para el aceite esencial de *Origanum vulgare*, un comportamiento cuadrático de las principales variables de fermentación, recalando que con las dosis menores se obtuvieron los mejores resultados, aquí no fue en las primeras dosis, pero si en una intermedia, siendo la de 560 ppm de AEOE la que mejores parámetros registró.

La parcial mejora en la fermentación de las fracciones de fermentación observada din la adición de AEO coincide con lo que afirmaron Albores-Moreno *et al.* (2018) y Jiménez-Santiago *et al.* (2019), quienes encontraron los mejores valores de fermentación *in vitro* con arbóreas con un bajo contenido de taninos condensados y alcaloides, y la ausencia de saponinas, que son similares en efecto a los terpenos del AEO.

La disminución de la degradabilidad con respecto a incrementar linealmente la dosis de AEO (Tabla 3) concuerda con lo encontrado en múltiples estudios (Cobellis *et al.*, 2015; Patra y Yu *et al.*, 2012; Righi *et al.*, 2017), este último con un concentrado como sustrato (maíz molido) donde el AEOE tuvo un efecto marcado para reducir la degradabilidad de la MS. Otro estudio (Zhou *et al.*, 2020) reportó una tendencia cuadrática; mientras que en otro no reportaron ningún efecto (Castañeda *et al.*, 2018) todos estos con 24 h de incubación.

Para la presente investigación la inconsistencia en DIVMS24 que se presentó (Tabla 3), indica posiblemente una mayor unión microbiana de las bacterias a las partículas del alimento con una reducción de las bacterias fermentadoras de

carbohidratos no estructurales que no permitió una degradación consistente a este tiempo de 24 h, efecto que también encontraron Righi *et al.* (2017) iniciando a las 4 h de fermentación.

La inhibición de la digestión del alimento se debe a las actividades antimicrobianas no selectivas del aceite esencial de orégano que afectan una amplia gama de subpoblaciones microbianas. Los compuestos de peso molecular pequeño, como el carvacrol (componente principal de los aceites esenciales de orégano), tienen la capacidad de destruir las membranas adicionales de las bacterias gram-negativas mediante la eliminación de la unión de lipopolisacáridos y el aumento de la permeabilidad de las membranas citoplasmáticas (Calsamiglia *et al.*, 2007). Esto puede explicar porque el AEOM muestra una actividad antibacteriana más fuerte que AEOE.

Cinética de fermentación y producción de AGV's

Los parámetros de L y S no fueron diferentes por la adición de ninguno de los orígenes en sus diferentes dosis (Tabla 4), estos parámetros de fermentación ruminal generalmente no se ven afectados si la energía y proteína de la dieta son apropiadas para un funcionamiento normal del rumen (Blaxter y Wainman, 1962), esto puede evidenciar que la dieta utilizada como alimento para los ovinos donadores de inóculo y como sustrato tenía un buen balance entre estos dos nutrimentos. La L del AEOE es mucho mayor que la reportada por Benchaar *et al.* (2007), pero la asíntota de producción de gas (Vm) fue mayor para el presente estudio.

La marcada reducción en la producción total de gas *in vitro* después de la adición de AEOM podría atribuirse a la mayor concentración de carvacrol (>67%), lo que puede afectar la población microbiana ruminal y sus productos al fermentar la materia orgánica (Bhatta *et al.*, 2013; Patra *et al.*, 2017). El comportamiento de los resultados en la producción de gas contradice a los reportados con otras especies de Orégano como *Thymus capitatus* L. (Cobellis *et al.*, 2015) o cuando se combinó timol con carvacrol (Castañeda *et al.*, 2019) donde la producción de gas decreció conforme aumentó la dosis.

Los resultados obtenidos en el presente estudio con la adición de AEOE sobre producción de gas son diferentes a los reportados por Zhou *et al.* (2020). Estos autores observaron un comportamiento cuadrático en una fermentación a 24 h igual con *Origanum vulgare*, obteniendo el volumen más alto en la última dosis y en el control, cuando en este experimento se encontró en la dosis media de 560 ppm. Los resultados de Zhou *et al.* (2020) son similares a lo que encontrado en este trabajo con el AEOM ya que de

igual manera la producción de gas se encontró en la dosis más alta, así como en el control. Los resultados de AEOE difieren también de los obtenidos *in vitro* por Patra y Yu (2012) y Cobellis *et al.* (2016). En ambos estudios se reportó un marcado decremento de la producción de gas conforme se aumentaba la dosis de AEO.

Los ácidos grasos volátiles son los productos finales de la fermentación microbiana del rumen y representan el principal suministro de energía metabolizable para los rumiantes (Van Soest, 1982). La concentración total de AGV's es el resultado de la fermentación de la dieta, y la relación acetato:propionato más bajo refleja un cambio en la fermentación ruminal que es más eficiente para los sistemas de producción de rumiantes (Wolin *et al.*, 1997; Brockman, 2005).

Los aditivos naturales para alimentos, como el AEO, pueden ser útiles en la nutrición de rumiantes cuando determina un aumento de la producción total de AGV y ácido propiónico y una disminución de la proporción de ácido acético/propiónico (Calsamiglia *et al.*, 2007). Aunque como se describe en la literatura, la suplementación con aceites esenciales puede causar efectos contradictorios en la concentración total de AGV's (Benchaar *et al.*, 2008). Esto puede estar relacionado con la dosis ya que varios estudios demostraron que las concentraciones totales de AGV's no se vieron afectadas por el AEO en dosis bajas, o solo lo hicieron levemente, pero disminuyeron en dosis altas (Patra, 2011; Cobellis *et al.*, 2015).

La adición de AEO resultó en reducciones en la producción total de gas total (Tabla 4), lo que sugiere que la fermentación y la actividad microbiana se vieron afectadas negativamente con las dosis utilizadas. Estos efectos son consistentes con los hallazgos de otros autores (Castillejos *et al.*, 2006; Patra y Yu, 2012; Cobellis *et al.*, 2015). En general, algunos estudios demuestran que dosis altas de AEOE disminuyen la fermentación y la actividad microbiana (Busquet *et al.* 2006; Cobellis *et al.* 2015; Davidson y Naidu, 2000), pero en otro estudio con AEOM la concentración de ácido acético propiónico y butírico no tuvo ningún cambio debido al tratamiento (Muñoz-Cuautle *et al.*, 2022).

Busquet *et al.* (2006) observaron que, a las concentraciones más altas, el AEOE redujo la producción total de AGV's, como posible reflejo de la disminución de la digestión del alimento, resultados similares fueron reportados por Castillejos *et al.* (2006), suceso que en este estudio se puede confirmar con la degradabilidad que se encontró (Tabla 3) aunque en algunas dosis la degradabilidad aumentó. La razón por la que la degradabilidad podría aumentar con una disminución de los AGV puede estar relacionada

con la producción de enzimas microbianas extracelulares que mejoran la digestibilidad de la fibra y la MS (Priest, 1977), pero los productos de hidrólisis no se fermentaron a AGV.

En el rumen, las bacterias gram positivas son generalmente bacterias productoras de acetato y butirato, mientras que las gram negativas son generalmente bacterias productoras de propionato (Jouany, 1991). Es posible que el efecto del AEO en los microorganismos del rumen fuera selectivo, inhibiendo algunas cepas más que otras (Tekippe *et al.*, 2011; Patra y Yu, 2012). Por ejemplo, en el presente estudio, el AEOM puede haber afectado más a las cepas microbianas involucradas en la digestión de la fibra, como sugiere la menor proporción de acetato a propionato observada conforme se incrementa la dosis (Tabla 5) que es el efecto típico de los aditivos alimenticios como los ionóforos (McGuffey *et al.*, 2001), lo que coincide con los resultados de algunos investigadores que demostraron que algunos aceites esenciales tienen efectos positivos en las proporciones molares de AGV al disminuir la producción de acetato y aumentar la producción de propionato (Mohammed *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005). La resistencia o susceptibilidad de las bacterias del rumen puede depender más de la composición lipídica y la carga superficial neta de las membranas microbianas (Trombetta *et al.*, 2005).

Los efectos observados sugieren que el carvacrol tiene especificidad antimicrobiana y puede inhibir bacterias grampositivas (la mayoría de las bacterias productoras de acetato y butirato) o gramnegativas (normalmente bacterias productoras de propionato) de forma dependiente de la dosis, lo que sugiere que su uso puede ser confuso en un ambiente microbiano complejo como el rumen (Busquet *et al.*, 2006). El aumento en la concentración molar de propionato y butirato que se muestra en nuestro estudio con el AEOM coinciden con lo reportado con Benchaar *et al.* (2007) y Busquet *et al.* (2006) quienes obtuvieron incrementos similares utilizando carvacrol que se encuentra en mayor proporción en el AEO.

La disminución de acetato:propionato junto con el aumento en la proporción de butirato observado es consistente con lo obtenido por Cardozo *et al.* (2005) que se fundamenta en el perfil de fermentación comúnmente encontrado en los ionóforos como lo demuestra (Castillejos *et al.*, 2006) donde el timol actuó de manera similar a monensina reduciendo la proporción de acetato a propionato, y aumentó la proporción de propionato y butirato pero reduciendo la concentración total de AGV similar a lo obtenido en el presente estudio.

Las modificaciones moderadas del perfil de AGV's del rumen observadas en sistemas *in vitro* son probablemente más difíciles de reproducir *in vivo*, donde las condiciones son más complejas (por ejemplo, diferentes tasas de absorción de ácidos a través de la pared del rumen, tasas de rotación del rumen, diferentes proporciones entre población y sustrato), por lo que hace falta seguir investigando el mecanismo de acción de estos aditivos fitogénicos sobre la producción de AGV's.

Indicadores de impacto ambiental

La falta de respuesta en la producción de metano con la adición de AEO no concuerda con lo reportado por Patra y Yu (2012). Esto autores observaron que la producción de metano se redujo 13% con respecto al control, pero coincide con lo observado por Castañeda *et al.* (2018), quienes tampoco encontraron efectos en la producción de metano cuando probaron una mezcla de timol y carvacrol en la fermentación ruminal *in vitro*, mencionando que posiblemente se deba a las diferencias en las dietas de los donantes de líquido ruminal, además de los diferentes sustratos utilizados durante las incubaciones *in vitro* y el tiempo de recolección de líquido ruminal en relación con el consumo del animal, lo cual también pudo haber influenciado en el presente estudio, ya que la recolección del líquido ruminal fue 2 horas después del primer consumo de la mañana, aunado a que la dieta que se utilizó como sustrato era un concentrado con un nivel alto de azúcares y almidón (Tabla 2; FRF y FMF) lo que disminuyó la ruta del ácido acético y la predisposición de H⁺ en el ambiente (Eugene *et al.*, 2004). Se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo exacto por el cual AEO reduce la producción de metano.

Como se mencionó previamente, en el presente estudio el sustrato y la dieta de los animales donadores de inóculo fue un concentrado con alto contenido de carbohidratos y el tipo de estos parece ser un factor determinante en la producción de CH₄ (Fernández-Mayer, 2001). Aunque no hubo diferencia significativa (P>0.05) en la producción de metano, fue menor que 16% del gas producción en todos los tratamientos, lo que corresponde a dietas altas en concentrado. A su vez, el valor fue menor que en dietas altas en forraje (>20%) según lo que dicta Dumortier *et al.* (2017). El IPCG tampoco se vio influenciado ni por el tipo de AEO, ni por la dosis, este nuevo indicador está determinado por la energía que contenga la dieta, que en este caso era alta, esto causó no ver diferencias claras, además de que el alimento esta balanceado en todos sus nutrientes por lo que fermento de manera sincronizada (Martínez-Hernández *et al.*, 2019). El metano mantiene una estrecha relación con el IPCG debido a que es 23 más contaminante (Yan *et al.*, 2010)

que el dióxido de carbono, por tanto, no se encontró diferencia en ninguno de estos parámetros. Como este es un experimento *in vitro* los parámetros de impacto ambiental solo se estimaron en base a la cantidad de sustrato fermentado, pero en condiciones de producción habría que estimar en base a unidad de producto (litros de leche, gramos de ganancia de peso etc.) o de tiempo (día, periodo, lactancia) y entonces podría ser más probable encontrar diferencias de la adición de AEO.

CONCLUSIONES

El AEOM afecta la fracción de mediana fermentación y la de fermentación total ya que los valores aumentan conforme aumenta la dosis, el AEOE alcanza niveles altos de fermentación en una dosis intermedia (560 ppm), la degradabilidad *in vitro* cambió de acuerdo con el nivel de inclusión, siendo las dosis altas las que más disminuyen la degradabilidad. El AEOM también reduce la producción de gas con respecto al control y al AEOE, pero vuelve más eficiente la producción de AGV's aumentando la producción de propiónico y reduciendo su relación con respecto al acético, para este experimento no hubo diferencias en la producción de metano, ni en los indicadores ambientales, por lo que hace falta investigar más sobre como el AEO puede afectar las emisiones entéricas de CH₄ en los rumiantes. El AEOM puede modular de mejor manera de la fermentación ruminal que el AEOE, pero disminuye más la digestión y la producción de gas total.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México y a la Universidad Autónoma Chapingo, particularmente al laboratorio de Microbiología Pecuaria por el apoyo en montar la fermentación *in vitro*. También agradecemos a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el brindar el equipo para la determinación ácidos grasos volátiles, así como a AQUA LAB por el alimento y los análisis bioquímicos.

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

Conflict of interests. Nothing to declare.

Cumpliance with ethical standards. All experimental procedures were approved by the Institutional Review Board of the Graduate Program in Animal Production, in accordance with the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals established in the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1995).

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

Author contribution statement (CRediT). **A.G. Carrillo-Hurtado** - Conceptualization, Investigation, Data curation, Writing – original draft. **L.A. Miranda-Romero** - Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review and editing. **M. Huerta-Bravo** – Project administration, Supervision. **J.R. Kawas-Garza** - Visualization, Validation, Supervision. **G. Mendez-Zamora** – Data curation, Formal analysis, Writing – review and editing. **Y. Ramos-Zayas** - Visualization, Validation, Writing – review and editing. **D.S. Rico-Costilla** – Methodology, Validation, Visualization. **N. Galindo-Dorantes**- Writing – review and editing.

REFERENCES

- Albores-Moreno, S., Alayon-Gamboa, J. A., Miranda-Romero, L. A., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J. C. and Vargas-Villamil, L., 2018. Nutritional composition, in vitro degradation and potential fermentation of tree species grazed by ruminants in secondary vegetation (*Acahual*) of deciduous forest: *Journal of Animal & Plant Sciences*, 28(5), pp.1263-1275. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-28-05/06.pdf>
- Baser, K. H. C., 2002. The turkish origanum species. In: S.E. Kintzios, ed. *Oregano. The Genera Origanum and Lippia*, London: CRC Press. p.109.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Benchaar, C., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Beauchemin, K. A. and McAllister, T. A., 2007. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Canadian Journal of Animal Science*, 87(3), pp. 413-419. <http://dx.doi.org/10.4141/CJAS07012>
- Berra, G., Finster, L. and Valtorta, S. E., 2009. Una técnica sencilla para la medición de emisiones de metano entérico en vacas. *Ciencias Veterinarias*, 8, pp. 49-56. <http://dx.doi.org/10.14409/favecv.v8i1.1479>
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K. T. and Prasad, C. S., 2013. In vitro fermentation profile and methane reduction in ruminal cultures containing secondary plant compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), pp. 455-465. <https://doi.org/10.1111/jam.12238>
- Blaxter, K. L. and Wainman, F. W., 1966. The fasting metabolism of cattle. *British Journal of Nutrition*, 20(1), pp. 103-111. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19660012>
- Blümmel, M. and Lebzien, P., 2001. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by in vitro techniques. *Livestock Production Science*, 68(2), pp. 107-117. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00241-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00241-4)
- Brockman, R. P., 2005. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. In: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Wallingford UK: CABI Publishing. pp. 291-310. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851998145.0291>
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C., 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89(2), pp. 761-771. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72137-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3)
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W. and Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88(7), pp. 2508-2516. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72928-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72928-3)
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L. and Ferret, A., 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90: pp. 2580-2595. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Calvo-Irabien, L. M., 2018. Native Mexican aromatic flora and essential oils: Current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. *Industrial Crops and Products*, 111, pp. 807-822. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.044>

- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C., 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83(11), pp. 2572-2579. <http://dx.doi.org/10.2527/2005.83112572x>
- Castañeda-Correa, A., Corral-Luna, A., Hume, M. E., Anderson, R. C., Ruiz-Barrera, O., Castillo-Castillo, Y., Rodriguez-Almeida, F., Salinas-Chavira, J. and Arzola-Alvarez, C., 2019. Effects of thymol and carvacrol, alone or in combination, on fermentation and microbial diversity during in vitro culture of bovine rumen microbes. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(3), pp. 170-175. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2018.1536580>
- Castillejos, L., Calsamiglia, S. and Ferret, A., 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of Dairy Science*, 89(7), pp. 2649-2658. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72341-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-4)
- 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*, 7(9), pp. 12856-12869. <http://dx.doi.org/10.3390/su70912856>
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., Marcotullio, M. C. and Yu, Z., 2016. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 215, pp. 25-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.008>
- Danielsson, R., Ramin, M., Bertilsson, J., Lund, P. and Huhtanen, P., 2017. Evaluation of a gas in vitro system for predicting methane production in vivo. *Journal of Dairy science*, 100(11), pp. 8881-8894. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12675>
- Davidson, P. M. and Naidu, A. S., 2000. Phyto-phenols. *Natural Food Antimicrobial Systems*, 226, pp. 284-287.
- Dumortier, P., Aubinet, M., Beckers, Y., Chopin, H., Debaq, A., de la Motte, L. G., Jérôme., E. Wilmus., F. and Heinesch, B., 2017. Methane balance of an intensively grazed pasture and estimation of the enteric methane emissions from cattle. *Agricultural and Forest Meteorology*, 232, pp. 527-535. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.09.010>
- Ellis, J.L., Bannink, A., France, J., Kebreab, E. and Dijkstra, J., 2010. Evaluation of enteric methane prediction equations for dairy cows used in whole farm models. *Glob. Global Change Biology*, 16, pp. 3246-3256. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02188.x>
- Elmasry, A. M. A., Mendoza, G. D., Miranda, R. L. A., Vazquez, G., Salem, A. Z. M. and Hernandez, P. A., 2016. Effects of types and doses of yeast on gas production and in vitro digestibility of diets containing maize (*Zea mays*) and lucerne (*Medicago sativa*) or oat hay. *South African Journal of Animal Science* 46(4), pp. 391-397. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v46i4.7>
- Eugène, M., Archimède, H. and Sauvant, D., 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science*, 85(1), pp. 81-97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00117-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00117-9)
- Fernández-Mayer, A., 2001. Efecto de la sincronización de energía-proteína sobre la performance animal. *EEA INTA Bordenave*, pp. 7-13.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010. *Greenhouse gas emissions from the dairy sector: a life cycle assessment*. A report prepared by Food and Agriculture Organization of the United Nations, Animal Production and Health division. Rome:FAO. <https://www.fao.org/4/k7930e/k7930e00.pdf>
- Ghazi, S., Amjadian, T. and Norouzi, S., 2015. Single and combined effects of vitamin C and oregano essential oil in diet, on growth performance, and blood parameters of broiler

- chicks reared under heat stress condition. *International Journal of Biometeorology*, 59(8), pp. 1019-1024. <http://dx.doi.org/10.1007/s00484-014-0915-4>
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E. and McSweeney, C. S., 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), pp. 421-426. <https://doi.org/10.22358/jafs/74464/2007>
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), pp. 2831-2846. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Jiménez-Santiago, Á., Jiménez-Ferrer, G., Alayón-Gamboa, A., Pérez-Luna, E. D. J., Piñeiro-Vázquez, A. T., Albores-Moreno, S., Pérez-Escobar, M. G. and 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), pp. 298-314. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4529>
- Jouany, J.P., 1991. *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*, Paris:INRA.
- Macheboeuf, D., Morgavi, D.P., Papon, Y., Mousset, J.L. and Arturo-Schaan, M., 2008. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumenmicrobial population. *Animal Feed Science and Technology*. 145, pp. 335-350. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.044>
- Martínez-Hernández, B. E., Salvador-Flores, O. and Miranda-Romero, L. A., 2019. Indicador de calentamiento global a partir de la fermentación ruminal de alimentos con diferentes niveles de energía y proteína. *Pastos y Forrajes*, 42(4), pp. 285-289.
- Mata-González, R. and Meléndez-González, R., 2005. Growth characteristics of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) under salt stress. *The Southwestern Naturalist*, 50, pp. 1-6. [http://dx.doi.org/10.1894/0038-4909\(2005\)050%3C0001:GCOMOL%3E2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1894/0038-4909(2005)050%3C0001:GCOMOL%3E2.0.CO;2)
- McGuffey, R. K., Richardson, L. F. and Wilkinson, J. I. D., 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *Journal of Dairy Science*, 84, pp. 194-203. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70218-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70218-4)
- Méndez Zamora, G., Durán Meléndez, L. A., Hume, M. E. and Silva Vázquez, R., 2017. Performance, blood parameters, and carcass yield of broiler chickens supplemented with Mexican oregano oil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(6), pp. 515-520. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017000600006>
- Méndez-Zamora, G., Durán-Meléndez, L. A., Aquino-López, J. L., Santellano-Estrada, E. and Silva-Vázquez, R., 2016. Efecto del aceite de orégano (*Poliomintha longiflora* Gray) sobre la productividad y calidad de carne de conejos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(8), pp. 259-265.
- Menke, K. H. and Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, pp. 7-55.
- Miranda, R. L. A., Vazquez M. P., Amendola, M. R., Sandoval, G. L. and González, O. R., 2015. Cuantificación de las fracciones fermentables de alfalfa y tuna por la técnica de producción de gas, In: Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ed). XXIV Congreso de la asociación Latinoamericana de producción animal y XL Congreso de la sociedad chilena de producción animal. Puerto Varas, Chile, p. 575.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S. and Itabashi, H., 2004. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *Journal of Animal Science*, 82(6), pp. 1839-1846. <https://doi.org/10.2527/2004.8261839x>
- Monforte-Briceño, G. E., Sandoval-Castro, C. A., Ramírez-Avilés, L. and Leal, C. M. C., 2005. Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to in vitro gas production. *Animal Feed Science and Technology*, 123, pp. 313-

327.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.016>
- Muñoz-Cuautle, A., Ortega-Cerrilla, M. E., Herrera-Haro, J. G., Ramírez-Bribiesca, J. E. and Zetina-Córdoba, P., 2022. 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*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25, pp. 081.
<http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4245>
- NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine)., 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. *National Academies Press*, Washington, D.C.
- NOM NOM-062-ZOO-1999., 1999. Norma Oficial Mexicana, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Accessed March 2021.
<http://www.economia-noms.gob.mx/noms/consultasAction.do>
- Patra, A. K., 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(5), pp. 416-428.
<http://dx.doi.org/10.3923/ajava.2011.416.428>
- Patra, A. K. and Yu, Z., 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), pp. 4271-4280.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00309-12>
- Patra, A., Park, T., Kim, M. and Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), pp. 1-18.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Peng, Q. Y., Li, J. D., Li, Z., Duan, Z. Y. and Wu, Y. P., 2016. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 214, pp. 148-153.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>
- Piñon, M. I., Alarcon-Rojo, A. D., Renteria, A. L., Mendez, G. and Janacua-Vidales, H., 2015. Reduction of microorganisms in marinated poultry breast using oregano essential oil and power ultrasound. *Acta Alimentaria*, 44(4), pp. 527-533.
<http://dx.doi.org/10.1556/066.2015.44.0024>
- Priest, F. G., 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3), pp. 711-753.
<http://dx.doi.org/10.1128/br.41.3.711-753.1977>
- Reyer, H., Zentek, J., Männer, K., Youssef, I. M., Aumiller, T., Weghuber, J. and Mueller, A. S., 2017. Possible molecular mechanisms by which an essential oil blend from star anise, rosemary, thyme, and oregano and saponins increase the performance and ileal protein digestibility of growing broilers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(32), pp. 6821-6830.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01925>
- Righi, F., Simoni, M., Foskolos, A., Beretti, V., Sabbioni, A. and Quarantelli, A., 2017. In vitro ruminal dry matter and neutral detergent fibre digestibility of common feedstuffs as affected by the addition of essential oils and their active compounds. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26(3), pp. 204-212.
<http://dx.doi.org/10.22358/jafs.76754/2017>
- SAS., 2021. Institute Inc., SAS/STAT. Software, ver. 9.4. SAS, Cary, NC, USA.
- Schofield, P. and Pell, A. N., 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *Journal of Animal Science*. 73(11), pp. 3455-3463.
<http://dx.doi.org/10.2527/1995.73113455x>
- Silva-Vázquez, R., Duran-Meléndez, L. A., Hernández-Martínez, C. A., Gutiérrez-Soto, J. G., Hume, M. E. and Méndez-Zamora, G., 2018. Effects of two sources of Mexican oregano oil on performance, blood profile, carcass variables, and meat of broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47, pp. e20170198.
<http://dx.doi.org/10.1590/rbz4720170198>

- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, and M. Arsenakis., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, pp1202–1205. <http://dx.doi.org/10.1021/jf950540t>
- Tekippe, J. A., Hristov, A. N., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Zheljzkov, V. D., Ferreira, J. F. S., Karnati, S. K. and Varga, G. A., 2011. Rumen fermentation and production effects of Origanum vulgare L. leaves in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(10), pp. 5065-5079. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4095>
- 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(3–4), pp. 185–197. [http://dx.doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](http://dx.doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. and Bisignano, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), pp. 2474-2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D. and González-Ríos, H., 2017. Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), pp. 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0133-94o>
- Van Soest, P. J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press. Ithaca, NY.
- Wang, Z., Li, X., Zhang, L., Wu, J., Zhao, S. and Jiao, T., 2022. Effect of oregano oil and Cobalt lactate on sheep in vitro digestibility, fermentation characteristics and rumen microbial community. *Animals*, 12(1), pp. 118. <https://doi.org/10.3390/ani12010118>
- Wolin, M. J., Miller, T. L. and Stewart, C. S., 1997. Microbe-microbe interactions. In: *The rumen microbial ecosystem* (pp. 467-491). Springer, Dordrecht.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S. and Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), pp. 174-179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
- Yan, T., Mayne, C. S., Gordon, F. G., Porter, M. G., Agnew, R. E., Patterson, D. C., Ferris, C. P. and Kilpatrick, D. J., 2010. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(6), pp. 2630-2638. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2929>
- Zhong, R. Z.; Fang, Y., Sun, H. X., Wang, M. and Zhou, D. W., 2016. Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an in vitro gas production technique. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(2), pp. 414-423. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61046-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61046-5)
- Zhou, R., Wu, J., Lang, X., Liu, L., Casper, D. P., Wang, C., Zhang, L. and Wei, S., 2020. Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. *Journal of Dairy Science*, 103(3), pp. 2303-2314. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17234>