



EVALUACIÓN *in vitro* DE LOS EFECTOS DE 2-NITROETANOL Y NITROETANO EN LA METANOGÉNESIS Y FERMENTACIÓN RUMINAL

In vitro EVALUATION OF THE EFFECT OF 2-NITROETHANOL AND NITROETHANE ON METHANOGENESIS AND RUMINAL FERMENTATION

Agustín Corral-Luna^{1a}, Pedro Antonio Ochoa-García^{1b}, Adrián Omar Maynez-Pérez^{1c}, Martha María Arevalos-Sanchez^{1d}, Felipe Alonso Rodríguez-Almeida^{1e}, Einar Vargas-Bello-Pérez^{1f}, Alberto Muro-Reyes², Sergio Ramírez-Ordoñez^{1g*} y Bernardino Espinoza-Velasco^{3*}

^{1a} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México
<https://orcid.org/0000-0002-4089-6011>

^{1b} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México

^{1c} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México
<https://orcid.org/0009-0004-5919-1208>

^{1d} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México
<https://orcid.org/0000-0001-6227-8575>

^{1e} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México
<https://orcid.org/0000-0002-9686-764X>

^{1f} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México
<https://orcid.org/0000-0001-7105-5752>

² Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, C.P. 98500. Zacatecas, México
<https://orcid.org/0000-0001-5894-2736>

^{1g} Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. C.P. 31031. México
<https://orcid.org/0000-0002-1993-7675>

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental La Campana. Km 33.3 carretera Chihuahua – Ojinaga, C.P. 32912, Aldama, Chihuahua, México
<https://orcid.org/0000-0001-9983-4934>

* Autor para correspondencia: espinoza.bernardino@inifap.gob.mx; srordonez@uach.mx.

RESUMEN

La metanogénesis ruminal es considerada un proceso ineficiente ya que puede conducir a la pérdida de hasta el 12% de la energía total consumida por el rumiante. Estudios recientes han demostrado la capacidad antimetanogénica de nitrocompuestos como el 2-nitro-1-propanol y el ácido 3-nitro-1-propiónico en condiciones *in vitro*. No obstante, el efecto del 2-nitroetanol y del nitroetano no ha sido evaluado. El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de estos nitrocompuestos

para reducir la producción de metano en un sistema *in vitro* mediante tres incubaciones seriadas de 24 horas. Los resultados mostraron que todos los nitrocompuestos redujeron significativamente la producción de metano, alcanzando hasta un 98%. Sin embargo, también se observaron modificaciones en la producción de ácidos grasos volátiles. La producción total de gas no se vio afectada, mientras que la acumulación de hidrógeno aumentó, lo que sugiere un redireccionamiento metabólico hacia posibles vías alternas, como la vía del fumarato. Además, se observaron cambios en la diversidad microbiana con el nitroetano, el cual provocó reducciones iniciales notables en la microbiota ruminal. En conjunto, la suplementación discontinua en serie con 2-nitroetanol y nitroetano tiene un efecto significativo en la reducción de metano *in vitro*, manteniendo su eficacia a pesar de la adaptabilidad del ecosistema ruminal. No obstante, es necesario evaluar los productos finales derivados de su reducción.

Palabras clave: Metanogénesis, fermentación ruminal, nitrocompuesto.

ABSTRACT

Rumen methanogenesis is considered an inefficient process, as it can lead to the loss of up to 12% of the total energy consumed by the ruminant. Recent studies have demonstrated the antimethanogenic capacity of nitrocompounds such as 2-nitro-1-propanol and 3-nitro-1-propionic acid under *in vitro* conditions. However, the effects of 2-nitroethanol and nitroethane have not yet been evaluated. The objective of this study was to determine the capacity of these nitrocompounds to reduce methane production in an *in vitro* system using three consecutive 24-hour incubation periods. The results showed that all nitrocompounds significantly reduced methane production, achieving reductions of up to 98%. However, changes in volatile fatty acid production were also observed. Total gas production was not affected, whereas hydrogen accumulation increased, suggesting a metabolic redirection toward alternative pathways such as the fumarate pathway. In addition, changes in microbial diversity were observed with nitroethane, which caused notable initial reductions in the ruminal microbiota. Overall, discontinuous serial supplementation with 2-nitroethanol and nitroethane exerts a significant effect on methane reduction *in vitro*, maintaining its efficacy despite the adaptive capacity of the rumen ecosystem. Nevertheless, further studies are required to evaluate the final products of derived from their reduction.

Keywords: Methanogenesis, ruminal fermentation, nitrocompounds.

INTRODUCCIÓN

La producción de metano (CH_4) en el rumen se considera una pérdida de energía que representa hasta 12% de la energía total consumida por el rumiante (Beauchemin et al., 2020). Por otra parte, el CH_4 es un gas con potente efecto invernadero que contribuye al calentamiento global. La Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2024) estima que los rumiantes producen alrededor del 27% de las emisiones totales de CH_4 en los Estados Unidos. En México, estas emisiones representan 11,64% de las emisiones nacionales (INECC, 2022), por ello, contribuir a la reducción de las emisiones provenientes de la fermentación entérica de los rumiantes, es uno de los principales retos para la comunidad científica. En este sentido, entre las estrategias usadas para reducir las emisiones destacan, el uso de antibióticos (Xin et al., 2025), aceites esenciales (Patra y Yu, 2012), compuestos nitrogenados (Anderson et al., 2010; Martínez-Fernández et al., 2014), metabolitos secundarios

de plantas (Zhang et al., 2021), algas marinas y sus compuestos bioactivos (Abbott et al., 2020).

Sin embargo, la mayoría de estas estrategias presentan limitaciones para su aplicación a gran escala. Los ionóforos, por ejemplo, reducen la producción de CH_4 hasta 30% (Guan et al., 2006), pero a largo plazo su eficacia disminuye debido a la adaptación de los microorganismos ruminales (Marques y Cooke, 2021), además de la posible presencia de residuos en los productos de origen animal. Por otro lado, los aceites esenciales y metabolitos secundarios de origen vegetal han mostrado la capacidad de reducir la producción de CH_4 en condiciones *in vitro*; no obstante, su efecto no es específico hacia las arqueas metanogénicas, sino que afecta la microbiota ruminal en su conjunto (Paraskevakis, 2018). Esta falta de selectividad compromete la digestibilidad de los nutrientes y en consecuencia repercute negativamente la eficiencia productiva del animal (Patra y Yu, 2012).

En lo que respecta a los compuestos

nitrogenados como el Nitroetano, 2-nitropropanol, 2-nitroetanol (Anderson et al., 2003), ácido 3-nitro-1-propiónico (Ochoa-García et al., 2021), dimetil-2-nitroglutarato y 2-nitro-metil-propionato (Anderson et al., 2010), reducen la producción de CH₄ ruminal *in vitro* hasta en 97%. Por otro lado, el 3-nitrooxipropanol reduce la producción de CH₄ hasta 30% en condiciones *in vivo* (Martínez-Fernández et al., 2014; 2016). Recientemente, Ochoa-García et al. (2024) reportaron reducciones similares en la acumulación de CH₄ al usar etil nitroacetato y etil-2-nitro propionato; sin embargo, también reportaron reducciones en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's) y degradabilidad de la materia seca.

No obstante, no todos los nitrocompuestos son adecuados para usarse como aditivos ya que presentan algunas limitantes, como su alto costo, efectos negativos sobre la fermentación ruminal, principalmente producción de AGV's, o generación de subproductos tóxicos o de nulo valor nutricional (Ochoa-García et al., 2024). En la actualidad, solo el 3-nitrooxipropanol está autorizado para su uso masivo, aunque se ha observado que reduce el consumo de materia seca en bovinos (Romero-Perez et al., 2014; Vyas et al., 2016; Lee et al., 2020). Bajo este escenario, es indispensable encontrar nuevas alternativas para mitigar las emisiones entéricas de CH₄. En este sentido, nitrocompuestos como 2-nitroetanol (2-NEOH) y nitroetano (NE) usados en este estudio no han sido evaluados con anterioridad por lo que se desconoce su efecto potencial en la producción de CH₄ y sus efectos en las variables de fermentación ruminal y en la microbiota ruminal.

Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de 2-nitroetanol (2-NEOH) y nitroetano (NE) en la producción de CH₄ y diversidad microbiana en condiciones *in vitro* y comparar su efecto con otros nitrocompuestos como etil nitroacetato (ENA) y etil 2-nitropropionato (E-2-NPP) previamente evaluados por Ochoa-García et al. (2024).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se llevó a cabo en 2024, en el Laboratorio de Biotecnología para la Alimentación de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en el municipio de Chihuahua, Chihuahua, México; en las coordenadas geográficas 28,4878° N y 106,1342° W, a una altitud de 1.450 m.s.n.m. La zona se caracteriza por un clima semiseco templado, con una temperatura media anual de 18,2 °C.

Productos químicos

La pureza de los productos químicos fue de 97% en todos los casos, y fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Chemicals Inc. (St. Louis, Mo, EE. UU.).

Incubaciones *in vitro*

Se llevaron a cabo tres incubaciones (A, B y C) consecutivas de 24 h, mediante transferencias secuenciales del inóculo de la serie anterior a tubos nuevos precargados con medio fresco y sustrato. La incubación inicial (A) se inoculó con 1 mL de líquido ruminal fresco obtenido de dos vacas Hereford X Angus; transcurridas 24 h de incubación, se utilizó 1 mL de cada cultivo para inocular la siguiente serie de tubos (B y C) de acuerdo con la metodología descrita por Ochoa-García et al. (2024). Con la finalidad de asegurar la reproducibilidad y robustez, el ensayo fue replicado dos veces. Se usaron tubos de 18 x 150 mm con tapa de goma. Cada tubo se cargó previamente con 9 mL de medio basal (Gutierrez-Bañuelos et al., 2008) y 0,2 g de heno de alfalfa finamente molido (2 mm) como sustrato. Los tratamientos consistieron en los siguientes nitrocompuestos: 2-nitroetanol (2-NEOH), nitroetano (NE), etil nitroacetato (ENA), etil 2-nitropropionato (E-2-NPP) y Control. A cada tubo de incubación (tres por tratamiento) se adicionó 0,3 mL de solución stock de nitrocompuesto para alcanzar una concentración final de 12 mmol y al control se le adicionó 0,3 mL de agua destilada.

El líquido ruminal usado fue recolectado en la mañana, antes del primer alimento de dos vacas (Hereford x Angus) alimentadas con una ración de mantenimiento (paja de avena: ensilaje de maíz; 50:50). De cada vaca se tomaron 500 mL de líquido ruminal y se colocaron en un recipiente que se selló herméticamente y se trasladó al laboratorio. El líquido ruminal fresco se mezcló y filtró a través de dos capas de malla para queso bajo flujo constante de CO₂. Todas las soluciones stock se prepararon como solución salina (Gutiérrez-Bañuelos et al., 2007). Durante este procedimiento, tanto el líquido ruminal como las soluciones se mantuvieron a 37°C en baño maría.

Analítico

Al final de cada periodo de incubación (serie), se midió la producción total del gas (TG), mediante la determinación de la presión del espacio de cabeza en todos los tubos (Theodorou et al., 1994). Esta medición se realizó con un transductor de presión FESTO (SIEMENS, Múnich, Alemania). La composición del gas (CH₄ e H₂) se determinó por cromatografía (Allison et al., 1992). De las muestras tomadas a las 0 y 24 h se determinaron

las concentraciones de AGV's por cromatografía de gases (Clarus 400® de PerkinElmer, Waltham, MA, USA) provisto de una columna capilar de acero inoxidable Poropak-Q de 30 m de largo, se usó helio como gas acarreador a un flujo de 20 mL min⁻¹ (Salanitro y Muirhead, 1975). La producción de AGV's totales en el periodo se calculó restando la concentración inicial (0 h) de la concentración en el tiempo final (24 h) para cada serie.

Obtención de DNA microbiano

Al término de cada serie de incubaciones, de cada incubación se extrajo DNA genómico con la ayuda del kit ZymoBIOMICS™ DNA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Brevemente, se transfirieron 200 mg de muestra a tubos ZR BashingBead™ con 750 µL de solución de lisis para una homogeneización mecánica (5 min, FastPrep-24™), garantizando la ruptura de microorganismos recalcitrantes. El lisado se clarificó por centrifugación (10,000 × g, 1 min) y filtración en columna Zymo-Spin™ III-F. El ADN fue purificado mediante cromatografía de afinidad en columna de sílice (Zymo-Spin™ IIC) y diluido con 100 µL de agua libre de nucleasas.

El DNA obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro ND-1000 y se estandarizó a 10 ng µL⁻¹. Se hizo una amplificación por PCR para la obtención de copias de la región variable del DNAr de microorganismos totales (Muyzer et al., 1993; Hume et al., 2003). Los productos de PCR obtenidos se separaron a través de un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente desnaturante lineal del 35-65% a 150v y 60°C por 7 h (Dcode Universal Mutation System, Bio-Rad Laboratoire Inc.). Después de la electroforesis los geles fueron incubados por 15 min en Syber Green® (1:10000) y fotografiados por transiluminación UV (302 nm). La similitud en el patrón de bandeo se determinó por medio del coeficiente de DICE con el software GelCompar II v5.1.

Análisis estadístico

Los datos de producción total de gas (TG), CH₄, H₂ acumulados y ácidos grasos volátiles fueron analizados por separado para cada serie, ajustando un modelo lineal general de una sola vía de clasificación por tratamiento y cuando el efecto fue significativo, se realizaron comparaciones múltiples de medias ajustadas por mínimos cuadrados con corrección de Tukey para evaluar diferencias entre tratamientos (nitrocompuestos). Todas las variables se analizaron con el software estadístico SAS (Littell et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción total de gas, metano e hidrogeno

La producción total de gas (TG) entre tratamientos en todas las series fue similar (P>0,05; Tabla 1). Los efectos de la inclusión de nitrocompuestos son consistentes con estudios *in vitro* previos con ENA y E-2-NPP (Levent et al., 2023; Ochoa-García et al., 2024), 2-NEOH y NE (Zhang et al., 2020). Los resultados obtenidos sugieren que los nitrocompuestos no interfieren con la fermentación ruminal. En este sentido, la producción de gas derivado de la fermentación microbiana está estrechamente relacionado con la composición química del sustrato. Esta actividad metabólica da lugar principalmente a la generación de dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄), por la acción conjunta de bacterias, protozoarios y arqueas metanogénicas (Patra y Yu, 2012), por lo que, al mantener la misma composición química del sustrato, no alteró la TG a pesar de la inclusión de los nitrocompuestos.

La producción de CH₄ (Tabla 1) disminuyó significativamente en todos los tratamientos (P<0,05) y series. Estas reducciones en la producción de CH₄ fueron del orden de 96, 92 y 98%, para las series A, B y C, respectivamente. Estos resultados coinciden con estudios previos con NPA, ENA, E-2-NPP (Ochoa-García et al., 2024) y Zhang et al. (2020) con 2-NEOH y NE en condiciones similares.

La acumulación de H₂ fue mayor (P<0,05) en los tratamientos respecto al control (Cuadro 1) en las series A y B. En la serie C, no hubo diferencias en la acumulación de H₂ respecto al control. Además, hay una tendencia a incrementar la acumulación del H₂ a través de las series, que coincide con la disminución en la producción de CH₄. Como se sabe, el H₂ producido en la fermentación de los carbohidratos es el principal sustrato para la síntesis de CH₄ (Beauchemin et al., 2020). De acuerdo con las diferencias observadas en la producción de CH₄ entre el control y los tratamientos, entre 28,91 y 42,07 mmol de H₂ equivalentes por mL de líquido cultivado no fueron utilizados para reducir el CO₂ a CH₄. Sin embargo, la acumulación de H₂ en los tratamientos fue de 2,463 a 4,070 mmol mL⁻¹ de líquido incubado. En este sentido, el H₂ que no se usa para la reducción de CO₂ a CH₄ se deriva a vías metabólicas termodinámicamente más favorables como la síntesis de AGV's (Beauchemin et al., 2020), sin embargo, esta ruta metabólica no se observó en ninguno de los tratamientos en este ensayo, incluso, se redujo la acumulación de AGV's (Tabla 2). Esto se ha reportado previamente incluso en condiciones *in vivo* (Anderson et al., 2006), efecto atribuible

Tabla 1. Efecto de la suplementación de nitrocompuestos en la producción total de gas (TG), metano (CH₄) e hidrógeno (H₂) acumulado en condiciones *in vitro*.**Table 1. Effect of nitrocompounds supplementation on total gas (TG), methane (CH₄), and hydrogen (H₂) cumulative production under *in vitro* conditions.**

Parámetro	Tratamiento ¹	Serie		
		A	B	C
TG (mL)	Control	18,667	19,333	19,667
	ENA	19,367	16,933	18,000
	E-2-NPP	18,700	19,333	18,333
	2NEOH	19,367	17,200	18,500
	NE	15,200	15,000	16,000
	P valor	0,3219	0,1822	0,7541
CH ₄ Acumulado (mmol mL ⁻¹)	Control	43,507a	30,287a	29,980a
	ENA	1,473b	0,530b	1,197b
	E-2-NPP	1,443b	0,000b	0,967b
	2NEOH	1,370b	0,000b	1,357b
	NE	1,460b	2,243b	0,737b
	P valor	0,0001	0,0010	0,0019
H ₂ Acumulado (mmol mL ⁻¹)	Control	1,3933b	2,3333c	3,4767ab
	ENA	2,9433a	3,3467ab	3,900ab
	E-2-NPP	2,8733a	3,7467a	3,3900ab
	2NEOH	3,1500a	3,3833ab	4,0700a
	NE	2,4633ab	3,0233b	3,0100b
	P valor	0,0355	0,0017	0,0574

¹Tratamientos: Control; ENA, 12mm etil nitroacetato; e-2-NPP, 12mm etil 2-nitropropionato; 2NEOH, 12mm 2-nitroetanol; NE, 12mm nitroetano. a, b y c, valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

¹Treatments: Control; ENA, 12mm ethyl nitroacetate; E-2-NPP, 12mm ethyl 2-nitropropionate; 2NEOH, 12mm 2-nitroethanol; NE, 12mm nitroethane. a, b y c, values with different letters indicate significant differences between treatments.

a la sensibilidad de los microorganismos a los nitrocompuestos (Tan et al., 2024).

Se ha documentado que las bacterias ruminales pueden utilizar aceptores alternativos de electrones, entre los que incluyen compuestos nitrogenados (Iwamoto et al., 2002; Ungerfel y Kohn, 2006), sulfatos (Zhao y Zhao, 2022) y fumarato (Abrar, et al., 2016). El uso de estos compuestos como aceptores terminales de electrones resulta termodinámicamente más favorable que la metanogénesis, lo que permite desviar parte del H₂ hacia rutas metabólicas alternas y así reducir potencialmente la formación de CH₄.

Efectos sobre la diversidad microbiana

Todos los nitrocompuestos evaluados inducen modificaciones en la diversidad microbiana (Fig. 1). No obstante, NE indujo los cambios más notorios en la microbiota ruminal. El coeficiente de similitud de DICE entre control y NE en la Serie A fue de 58,0%, lo que indica una disimilitud

moderada. Esta disimilitud disminuyó progresivamente en las series subsecuentes, y alcanzó 82,1% en la Serie B y 91,8% en la Serie C, lo cual sugiere una recuperación gradual de la comunidad microbiana hacia un perfil similar al control. Este comportamiento coincide con lo observado para AGV's totales, TG, y H₂ donde el efecto de NE fue marcado, en comparación con los demás nitrocompuestos. De igual manera, estos resultados ponen de manifiesto la capacidad adaptativa de la microbiota ruminal. Aunque hasta el momento hay pocos estudios dedicados a describir las especies presentes tras la suplementación de nitrocompuestos, se especula que estas pueden involucrar a aquellas especies utilizadoras de H₂, como las metanogénicas. Estudios dirigidos a las especies involucradas podrían ayudar a describir los factores que favorecen la transferencia de H⁺ entre especies y limitan la producción de CH₄. En este sentido, Levent et al. (2023) reportaron el efecto bacteriostático del ENA. De manera similar, se

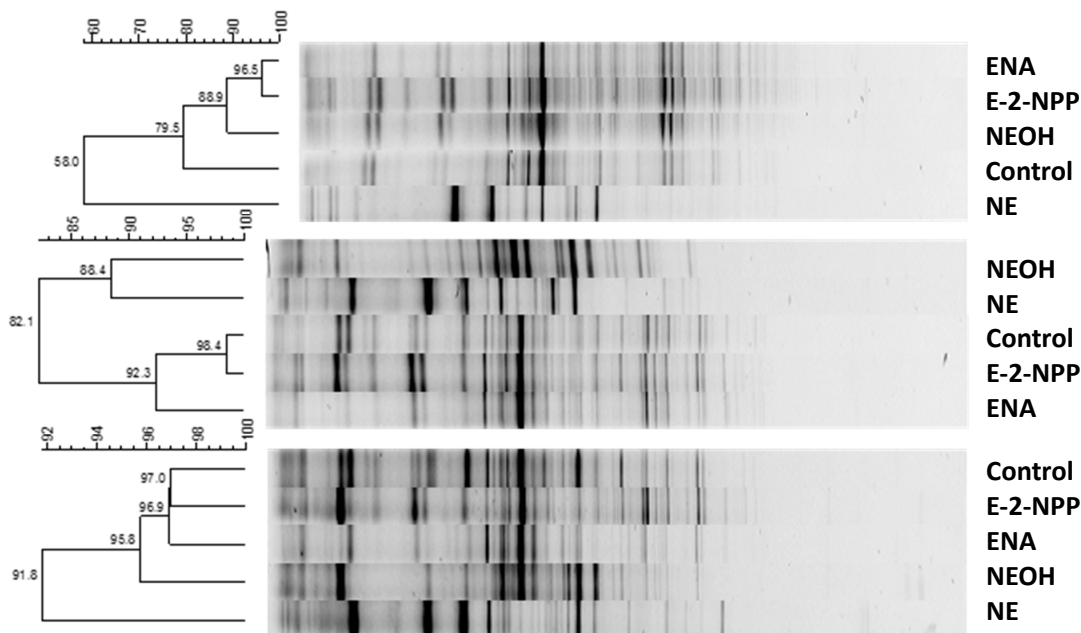


Fig. 1. Coeficientes de DICE para cultivos discontinuos de 24 horas suplementados con diferentes nitrocompuestos.

Fig. 1. DICE coefficients for 24-hour batch cultures supplemented with different nitrocompounds.

reportan efectos reductores en la abundancia de metanógenos, expresión del gen *mcrA* y contenido de las coenzimas F₄₂₀ y F₄₃₀ al incluir NE, NEOH y 2-Nitro-1-Propanol (Zhang et al., 2020) en condiciones *in vitro*. Recientemente, Tan et al. (2024) reportaron efectos supresores del NE en arqueas metanogénicas, principalmente del género *Methanobrevibacter*.

Efectos sobre la acumulación de ácidos grasos volátiles

Respecto a la producción de AGV's, en la serie A y B se reduce la producción de acetato con la inclusión de los nitrocompuestos, pero sin diferencias significativas (Tabla 2). En la serie C, el efecto de los nitrocompuestos se mantuvo, sin embargo, NE tuvo valores similares al control. Este comportamiento evidencia una posible adaptación de los microorganismos ruminales, reflejado en la diversidad bacteriana. Con la inhibición de la producción de CH₄, la eliminación de equivalentes reductores se da a través de un aumento en la síntesis de AGV's más reducidos como el propionato (Wang et al., 2016). Estos resultados difieren a los reportados en algunos estudios (Anderson et al., 2003; Anderson et al., 2010; Gutierrez-Bañuelos et al., 2008) en cuanto a la producción de AGV's total y acetato en la primera serie, pero coinciden con los niveles de producción en las series consecutivas (Tabla

2). Según estos resultados, solo una porción de equivalentes H₂ dedicados a la producción de CH₄ se reorientaron a la producción de AGV's más reducidos, pero sin incrementar las concentraciones molares de propionato, incluso hubo una tendencia a disminuir en las tres series.

Las proporciones molares de propionato producidas en los cultivos suplementados con 2NEOH y NE disminuyeron (P<0,001) en las tres series y ENA en el segundo y tercer serie; excepto E-2-NPP que en la serie C aumentó (P<0,001). Estos resultados indican que el propionato puede ser uno de los principales productos del metabolismo de E-2-NPP en el rumen. La baja acumulación de propionato en los demás tratamientos sugiere que los equivalentes reductores no se redireccionaron a la producción de este producto de fermentación reducido (Tabla 2). La baja acumulación (P=0,05) de propionato en la primera incubación con NE se relaciona con la acumulación de 2,46 mmol de H₂, valores superiores a 2,5 kPa de H₂ (equivalente a 1,48 mmol H₂), suficientes para promover la producción de propionato (Schulman y Valentino, 1975), lo que sugiere que hay un redireccionamiento del H₂ a vías alternas. Probablemente, a través del fumarato que funciona como aceptor de H₂ y que, además, redirecciona la ruta para la síntesis de propionato, esto daría una ventaja metabólica al utilizar el NE (Lan y Yang, 2019; Zhao y Zhao, 2022). En

Tabla 2. Efecto de la suplementación con nitrocompuestos sobre la producción de ácidos grasos volátiles *in vitro* en cultivos discontinuos de 24 horas.**Table 2. Effect of nitrocompounds supplementation on *in vitro* volatile fatty acid production in 24-hour batch cultures.**

Parámetro	Tratamiento ¹	Serie		
		A	B	C
Acetato ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	Control	65,616 \pm 11,214	84,450 \pm 6,102	93,293 \pm 4,491a
	ENA	40,426 \pm 11,214	66,690 \pm 6,102	70,340 \pm 4,491b
	E-2-NPP	34,396 \pm 11,214	69,973 \pm 6,102	88,973 \pm 4,491ab
	2NEOH	39,266 \pm 11,214	77,150 \pm 6,102	73,570 \pm 4,491b
	NE	28,588 \pm 11,214	68,870 \pm 6,102	93,070 \pm 4,491a
	P valor	0,1100	0,2137	0,0118
Propionato ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	Control	28,393 \pm 4,241a	31,703 \pm 1,922a	29,413 \pm 0,956ab
	ENA	27,723 \pm 4,241a	23,23 \pm 1,922b	22,113 \pm 0,956c
	E-2-NPP	28,036 \pm 4,241a	26,953 \pm 1,922ab	33,746 \pm 0,956a
	2NEOH	19,580 \pm 4,241ab	25,743 \pm 1,922ab	24,466 \pm 0,956c
	NE	2,410 \pm 4,241b	14,660 \pm 1,922c	26,253 \pm 0,956bc
	P valor	0,0076	0,2137	0,0006
Butirato ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)	Control	7,280 \pm 1,672	16,636 \pm 1,084a	19,820 \pm 0,737a
	ENA	9,016 \pm 1,672	17,046 \pm 1,084a	15,986 \pm 0,737b
	E-2-NPP	7,273 \pm 1,672	15,066 \pm 1,084ab	17,613 \pm 0,737ab
	2NEOH	4,18 \pm 1,672	11,260 \pm 1,084bc	9,620 \pm 0,737c
	NE	3,66 \pm 1,672	9,620 \pm 1,084c	11,286 \pm 0,737c
	P valor	0,1129	0,0011	0,0001

¹Tratamientos: Control; ENA, 12mm etil nitroacetato; E-2-NPP, 12mm etil 2-nitropropionato; 2NEOH, 12mm 2-nitroetanol; NE, 12mm nitroetano. a, b y c, valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

¹Treatments: Control; ENA, 12mm ethyl nitroacetate; E-2-NPP, 12mm ethyl 2-nitropropionate; 2NEOH, 12mm 2-nitroethanol; NE, 12mm nitroethane. a, b y c, values with different letters indicate significant differences between treatments.

lo que respecta al butirato, las concentraciones no cambiaron en la serie A, pero disminuyeron ($P < 0,001$) en las series posteriores con los tratamientos 2NEOH y NE. Las concentraciones fueron las más altas en la serie B con ENA, lo que sugiere que algunos de los equivalentes reductores dirigidos a la metanogénesis pueden haberse consumido durante la formación este AGV, contrario a lo observado con 2NEOH y NE. Debido a que las concentraciones de los ácidos grasos de cadena más largas son comúnmente más bajas, los valores de estos productos de fermentación no fueron reportados.

CONCLUSIONES

La suplementación en series de manera discontinua de 2-nitroetanol y nitroetano tiene un efecto significativo en la reducción de la producción de metano mayor de 95% sin afectar la producción de gas total. Por otra parte, hay una disminución en la acumulación de AGV's

con los dos nitrocompuestos que se relaciona con una mayor acumulación de H_2 en el medio. Así mismo, el análisis de la diversidad microbiana permitió observar que los tratamientos mantienen su efecto a pesar de la adaptabilidad del medio ruminal. No obstante, es necesario evaluar los productos finales de su reducción.

Contribución de los autores

Participación activa en la revisión bibliográfica: Agustín Corral-Luna, Sergio Ramírez-Ordoñez y Bernardino Espinoza-Velasco. Participación activa en la elaboración de la metodología: Agustín Corral-Luna, Pedro Antonio Ochoa-García, Adrián Omar Maynez-Pérez, Martha María Arevalos-Sánchez, Felipe Alonso Rodríguez-Almeida, Einar Vargas Bello-Pérez, Alberto Muro-Reyes, Sergio Ramírez-Ordoñez y Bernardino Espinoza-Velasco. Participación activa en la discusión de los resultados: Agustín Corral-Luna, Pedro Antonio Ochoa-García, Martha María Arevalos-Sánchez, Sergio Ramírez-

Ordoñez y Bernardino Espinoza-Velasco. Revisión y aprobación de la versión final del artículo: Agustín Corral-Luna, Sergio Ramírez-Ordoñez y Bernardino Espinoza-Velasco.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. D., I. Aasen, K. Beauchemin, F. Grondahl, R. Gruninger, M. Hayes, S. Huws, D. Kenny, S. J. Krizsan, S. Kirwan, V. Lind, U. Meyer, M. Ramin, K. Theodoridou, D. von Soosten, P. Walsh, S. Waters, and X. Xing. 2020. Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: Challenges and opportunities. *Animals* 10(12):2432. <https://doi.org/10.3390/ani10122432>
- Abbrar, A., M. Kondo, T. Kitamura, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. 2016. Effect of supplementation of rice bran and fumarate alone or in combination on *in vitro* rumen fermentation, methanogenesis and methanogens. *Animal Science Journal* 87:398-404. <https://doi.org/10.1111/asj.12431>
- Allison, M.J., W. R. Mayberry, C. McSweeney, and D. Stahl. 1992. *Synergistes jonesii*, gen. Nov., sp. nov.: a ruminal bacterium that degrades toxic pyridinediols system. *Applied Microbiology* 15(4):22-529. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80111-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80111-6)
- Anderson, R., G. Carstens, R. Miller, T. Callaway, C. Schultz, T. Edrington, R. Harvey, and D. Nisbet. 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *Bioresource Technology* 97(18): 2421-6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.013>
- Anderson, R., J. Huwe, D. Smith, T. Stanton, N. Krueger, T. Callaway, T. Edrington, R. Harvey, and D. Nisbet. 2010. Effect of nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2-nitro-methyl-propionate on ruminal methane production and hydrogen balance *in vitro*. *Bioresource Technology* 101(14):5345-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.108>
- Anderson, R., T. Callaway, J. Van Kessel, Y. Jung, T. Edrington, and D. Nisbet. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresource Technology* 90(1):59-63. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00086-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00086-5)
- Beauchemin, K., E. Ungerfeld, E. Eckard, and M. Wang. 2020. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* 14(S1):s2-s16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- EPA. 2024. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2022. United States Environmental Protection Agency, EPA 430-R-24-004. <https://www.epa.gov/ghgemissions/inventory-us-greenhouse-gas-emissions-and-sinks-1990-2022>. Washington, DC. USEPA #430- R-06-002.
- Guan, H., K. Witthenberg, K. Omsinski, and D. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science* 84(7):1896-906. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-652>
- Gutierrez-Bañuelos, H., R. Anderson, G. Carstens, L. Slay, N. Ramlachan, S. Horrocks, T. Callaway, T. Edrington, and D. Nisbet. 2007. Zoonotic bacterial populations, gut fermentation characteristics and methane production in feedlot steers during oral nitroethane treatment and after the feeding of an experimental chlorate product. *Anaerobe* 13(1):21-31. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.11.002>
- Gutierrez-Bañuelos, H., R. Anderson, G. Carstens, L. Tedeschi, W. Pinchak, E. Cabrera-Diaz, N. Krueger, T. Callaway, and D. Nisbet. 2008. Effects of nitroethane and monensin on ruminal fluid fermentation characteristics and nitrocompound-metabolizing bacterial populations. *Journal Agricultural Food Chemistry* 56(12):4650-8. <https://doi.org/10.1021/jf800756c>
- Hume, E., F. Kubena, S. Edrington, J. Donskey, W. Moore, C. Ricke, and J. Nisbet. 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poultry Science* 82(7):1100-1107. <https://doi.org/10.1093/ps/82.7.1100>
- INECC. 2022. Inventario nacional de emisiones de gases y compuestos de efecto invernadero INEGyCEI 2020 - 2021. Disponible en <https://datos.gob.mx/busca/dataset/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero-inegycei> (consulta 11 marzo 2025).
- Iwamoto, M., N. Asanuma, and T. Hino. 2002. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe* 8:209-215. <https://doi.org/10.1006/anae.2002.0428>
- Lan, W., and C. Yang. 2019. Ruminal methane production: associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment* 654:1270-1283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.180>

- Lee, C., S. Kim, K. Beauchemin, P. Celi, and S. Duval. 2020. Short-term eating preference of beef cattle fed high forage or high grain diets supplemented with 3-Nitrooxypropanol. *Animals* 10:64. <https://doi.org/10.3390/ani10010064>
- Levent, G., A. Božić, B. Petrujkić, T. Callaway, T. Poole, T. Crippen, Roger B. Harvey 5, P. Ochoa-García, A. Corral-Luna, K. Yeater, and R. Anderson. 2023. Assessment of potential anti-methanogenic and antimicrobial activity of ethyl nitroacetate, α -lipoic acid, taurine and L-cysteinesulfinic acid *in vitro*. *Microorganisms* 12(1):34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010034>
- Littell, C., W. Stroup, G. Milliken, R. Wolfinger, and O. Schabenberger. 2006. SAS for mixed models. SAS institute.
- Marques, R., and Cooke, R. 2021. Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. *Animals* 11:2871. <https://doi.org/10.3390/ani11102871>
- Martínez-Fernández, G., L. Abecia, A. Arco, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Martín-García, E. Molina-Alcaide, M. Kindermann, S. Duval, and D. Yáñez-Ruiz. 2014. Effects of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol on ruminal fermentation, microbial abundance, and methane emissions in sheep. *Journal Dairy Science* 97(6):3790–3799. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7398>
- Martínez-Fernández, G., S. Denman, C. Yang, J. Cheung, M. Mitsumori, and C. Mcsweeney. 2016. Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle. *Frontiers in Microbiology* 7:1122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01122>
- Muyzer, G., E. De Waal, and G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3):695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Ochoa-García, P., R. Anderson, F. Rodríguez-Almeida, A. Maynez-Pérez, M. Félix-Portillo, A. Muro-Reyes, A. Božić, M. M. Arevalos-Sánchez, E. Vargas-Bello-Pérez, A. Corral-Luna. 2024. Effect of nitro compounds on *in vitro* ruminal methane, carbon dioxide, hydrogen and dry matter degradability. *Chilean Journal Agricultural & Animal Science* 40(1):190-197. <http://dx.doi.org/10.29393/chjaas40-18enpa100018>
- Ochoa-García, P., R. Anderson, M. M. Arévalos-Sánchez, F. Rodríguez-Almeida, M. Félix-Portillo, A. Muro-Reyes, A. Božić, C. ArzolaÁlvarez, A. CorralLuna. 2021. *Astragalus mollissimus* plant extract: A strategy to reduce ruminal methanogenesis. *Tropical Animal Health Production* 53(4):436. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02882-1>
- 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* 102:701–705. <https://doi.org/10.1111/jpn.12812>
- Patra, K., and Z. Yu. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 78:4271–4280. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>
- Romero-Perez, A., E. Okine, S. McGinn, L. Guan, M. Oba, S. Duval, M. Kindermann, and K. Beauchemin. 2014. The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. *Journal of Animal Science* 92(10):4682–4693. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7573>
- Salanitro, P., and P. Muirhead. 1975. Quantitative method for the gas chromatographic analysis of short-chain monocarboxylic and dicarboxylic acids in fermentation media. *Applied Microbiology* 29(3):374–381. <https://doi.org/10.1128/am.29.3.374-381.1975>
- Schulman, D., and D. Valentino. 1975. Factors influencing rumen fermentation: effect of hydrogen on formation of propionate. *Journal of Dairy Science* 59(8):1444–1451. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84383-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84383-4)
- Tan, J., Y. Wang, H. Niu, L. Li, H. Zhao, L. Fang, L. Jiang, and Y. Zhao. 2024. Metagenomic insights into the mechanistic differences of plant polyphenols and nitrocompounds in reducing methane emissions using the rumen simulation technique. *Science of The Total Environment* 953:176135. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176135>
- Theodorou, K, B. Williams, M. Dhanoa, A. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* 48:185–197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)

- Ungerfeld, M., and R. Kohn. 2006. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. p. 55-85. In K. Sejrsen, T. Hvelplund, and M. O. (eds.). Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. Wageningen academic, Wageningen.
- Vyas, D., S. McGinn, S. Duval, M. Kindermann, and K. Beauchemin. 2016. Effects of sustained reduction of enteric methane emissions with dietary supplementation of 3-nitrooxypropanol on growth performance of growing and finishing beef cattle. *Journal of Animal Science* 94(5):2024–2034. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0268>
- Wang, M., R. Wang, T. Xie, P. Janssen, X. Sun, K. Beauchemin, Z. Tan, and M. Gao. 2016. Shifts in rumen fermentation and microbiota are associated with dissolved ruminal hydrogen concentrations in lactating dairy cows fed different types of carbohydrates. *Journal of Nutrition* 146:1714–1721. <https://doi.org/10.3945/jn.116.232462>
- Xin, X., C. Yurong, L. Qiushuang, L. Qi, Y. Xingze, W. Rong, Z. Xiumin, T. Zhiliang, L. Bo, and W. Min. 2025. Mitigating enteric methane emissions: An overview of methanogenesis, inhibitors and future prospects. *Animal nutrition* 21:84–96. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2025.02.001>
- Zhang, F., B. Li, Z. Ban, H. Liang, L. Li, W. Zhao, and X. Yan. 2021. Evaluation of origanum oil, hydrolysable tannins and tea saponin in mitigating ruminant methane: *in vitro* and *in vivo* methods. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 105(4):630-638. <https://doi.org/10.1111/jpn.13501>.
- Zhang, Z., W. Yanlu, L. Xuemng, C. Zhijun, L. Shengli, and Y. Hongjian. 2020. Rumen methanogenesis, rumen fermentation, and microbial community response to nitroethane, 2-nitroethanol, and 2-nitro-1-propanol: An *in vitro* study. *Animals* 10:479. <https://doi.org/10.3390/ani10030479>
- Zhao, Y., and G. Zhao. 2022. Decreasing ruminal methane production through enhancing the sulfate reduction pathway. *Animal nutrition* 9:320-326. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.01.006>