



**CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA**

**“Efecto de lovastatina sobre la producción de metano,
fermentación, y microbiota ruminal”**

Tesis que presenta

M. en C. Amaury Ábrego García

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis: **Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**

Ciudad de México

Octubre de 2021

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo, Director
Investigador Titular 3D
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV

Dra. María Teresa Ponce Noyola, Asesor
Investigador Titular 3D
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV

Dr. Graciano Calva Calva, Asesor
Investigador Titular 3C
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV

Dra. Josefina Barrera Cortés, Asesor
Investigador Titular 3C
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV

Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer, Asesor
Investigador Titular
Departamento de Ingeniería Bioquímica
ENCB del IPN

Mtra. Elvira Ríos Leal, Asesor extraordinario
Investigador Titular 1C
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV

Dr. Daniel Estrada Bárcenas, Asesor extraordinario
Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares
CINVESTAV

M. C. Alfredo Mendoza Vargas, Asesor extraordinario
Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Vania S. Robles González, Asesor extraordinario
Profesor titular
Instituto de Hidrología
Universidad Tecnológica de la Mixteca

El trabajo experimental de esta tesis se realizó principalmente en los Laboratorios 33 y 34 “Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables” y en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Así como también, en la Unidad de Secuenciación y Polimorfismos del Instituto de Medicina Genómica, bajo la dirección del Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca Doctoral (CV: 337183) y por el financiamiento del proyecto, “Estudios sobre mitigación de producción de metano ruminal de bovinos utilizando lovastatina”, SEP-CONACYT, CB 2018-1, No. A1-S-26901.

Al Dr. Héctor M. Poggi Varaldo por confiar y respaldar este proyecto. Por compartir su experiencia científica y cotidiana, las cuales contribuyeron ampliamente en mi formación.

A mi comité tutorial, Dra. María Teresa Ponce Noyola, Dr. Graciano Calva Calva, Mtra. Elvira Ríos Leal, Dr. Daniel Estrada Bárcenas, M. C. Alfredo Mendoza Vargas, Dr. Vania Robles González, Dra. Josefina Barrera Cortés, y Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer, por su gran dedicación y compromiso con este proyecto. Además, por compartir conocimientos diversos que acertadamente mejoraron esta tesis.

Al I.Q. Gustavo G. Medina Mendoza y Oscar I. Rojas Gómez de la Central Analítica (DBB CINVESTAV) por su apoyo técnico especializado en el área de cromatografía.

Al B.D. Francisco Giovani Mercado Valle por su valiosa colaboración en el área de biología molecular y bioinformática.

Al Biol. Juan C. Estrada Mora de la Colección Nacional de Cepas Microbianas del CINVESTAV por la asesoría, servicios y apoyo en el área de microbiología.

A Ma. Alejandra Sinecio Moreno y Vania Muñoz Macias del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería por sus servicios secretariales.

Finalmente, agradezco al CINVESTAV por mantenerse ante cualquier embate como una institución de gran prestigio y por procurar las mejores condiciones para innumerables estudiantes.

DEDICATORIA

Con mucho cariño para mi hijo Amaury Ábrego Franco, tu amor y compañía siempre han abrazado mi jornada, este trabajo es para ti.

A mi madre Francisca García Silva por su amor y apoyo en cada etapa de mi vida, especialmente durante ésta última. La educación y consejos que me has trasmitido sostuvieron constantemente este proyecto.

De manera especial dedico esta tesis a mis hermanas Tania y Dxuladi por tanta paciencia, incondicional apoyo, y cariño que siempre he recibido de ustedes.

A mis sobrinos Amaury y Luis Enrique les dejo un poco de camino para que ustedes lo sigan.

Finalmente, a mis amigos de laboratorio Alejandra Yañez, Sara Abuanza, Catherine Mar Pineda, Alfredo Amaro, Francisco Mercado, Erick Justo, y José Moreno.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| ÍNDICE DE CUADROS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| NOTACIÓN..... | xi |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| | |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Fermentación ruminal..... | 2 |
| 1.2. Metanogénesis ruminal | 6 |
| 1.3. Clasificación y estructura de las estatinas..... | 8 |
| 1.4. La lovastatina como estrategia para inhibir las arqueas metanogénicas | 10 |
| 1.5. Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal..... | 13 |
| 1.5.1. Experimentos <i>in vitro</i> | 14 |
| 1.5.2. Experimentos <i>in vivo</i> | 16 |
| 2. Justificación | 19 |
| 3. Hipótesis general..... | 20 |
| 3.1. Hipótesis particulares | 20 |
| 4. Objetivo general | 21 |
| 4.1. Objetivos particulares | 21 |
| 5. Materiales y Métodos | 22 |
| 5.1. Estrategia de trabajo | 22 |
| 5.2. Actividad 1. Producción de lovastatina en fermentación en estado sólido | 24 |
| 5.2.1. Diseño experimental..... | 24 |
| 5.2.2. Mantenimiento de cultivo y suspensión de las esporas..... | 24 |
| 5.2.3. Sustrato de fermentación en estado sólido | 25 |
| 5.2.4. Análisis bromatológico | 25 |
| 5.2.5. Preparación y condiciones de fermentación en estado sólido..... | 25 |
| 5.2.6. Extracción y cuantificación de lovastatina | 26 |
| 5.2.7. Eficiencia de degradación lignocelulósica | 26 |
| 5.2.8. Análisis estadístico | 27 |
| 5.3. Actividad 2. Efecto del rastrojo de avena como portador de lovastatina sobre la producción de metano ruminal | 29 |
| 5.3.1. Diseño experimental..... | 29 |
| 5.3.2. Análisis bromatológico de las dietas experimentales | 29 |
| 5.3.3. Técnica producción de gas <i>in vitro</i> | 29 |
| 5.3.4. Cuantificación de gas total, metano e hidrógeno..... | 30 |
| 5.3.5. Determinación de ácidos grasos volátiles | 31 |
| 5.3.6. Análisis estadístico..... | 32 |
| 5.4. Actividad 3. Inhibición <i>in vitro</i> de la metanogénesis ruminal de una dieta alta en grano con lovastatina | 33 |
| 5.4.1. Diseño experimental..... | 33 |
| 5.4.2. Hidrólisis y determinación de la lovastatina en forma β - hidroxilácido | 33 |
| 5.4.3. Técnica de producción de gas <i>in vitro</i> | 334 |
| 5.4.4. Cuantificación de gas total y metano..... | 35 |
| 5.4.5. Determinación de ácidos grasos volátiles | 35 |

| | |
|---|----|
| 5.4.6. Análisis estadístico | 36 |
| 5.5. Actividad 4. Caracterización de comunidades microbianas del rumen..... | 37 |
| 5.5.1. Diseño experimental..... | 37 |
| 5.5.2. Extracción de DNA | 37 |
| 5.5.3. Secuenciación por amplicones..... | 37 |
| 5.5.4. Desnaturalización de bibliotecas y carga de muestra en la plataforma MiSeq..... | 40 |
| 5.6. Actividad 5. Análisis bioinformático | 41 |
| 5.6.1. Clasificación Taxonómica de las secuencias del gen rRNA16S..... | 41 |
| 5.6.2. Índices de alfa y beta diversidad | 41 |
| 5.6.3. Análisis estadístico | 41 |
| 5.7. Actividad 6. Inhibición <i>in vitro</i> de metano en bovinos productores de leche..... | 43 |
| 5.7.1. Diseño experimental..... | 43 |
| 5.7.2. Técnica de producción de gas <i>in vitro</i> | 43 |
| 5.7.3. Cuantificación de gas total y metano..... | 44 |
| 5.7.4. Determinación de ácidos grasos volátiles | 44 |
| 5.7.5. Remoción de la lovastatina | 45 |
| 5.7.6. Determinación de lovastatina | 45 |
| 5.7.7. Análisis estadístico | 46 |
| 6. Resultados y discusión | 47 |
| 6.1. Actividad 1. Producción de lovastatina en fermentación en estado sólido | 47 |
| 6.1.1. Análisis bromatológico de los sustratos | 47 |
| 6.1.2. Eficiencia de degradación lignocelulósica | 47 |
| 6.1.3. Producción de lovastatina | 49 |
| 6.2. Actividad 2. Efecto del rastrojo de avena fermentado como portador de lovastatina sobre la producción de metano ruminal | 52 |
| 6.2.1. Análisis bromatológico de las dietas experimentales | 52 |
| 6.2.2. Efecto del rastrojo de avena fermentado sobre la producción de metano ruminal y ácidos grasos volátiles | 53 |
| 6.3. Actividad 3. Inhibición <i>in vitro</i> de la metanogénesis ruminal de una dieta alta en grano con lovastatina | 56 |
| 6.3.1. Determinación de lovastatina en forma lactona y β -hidroxiácido..... | 56 |
| 6.3.2. Cinética de producción de gas total y metano..... | 56 |
| 6.3.3. Variables de fermentación ruminal | 58 |
| 6.4. Actividad 4. Caracterización de comunidades microbianas del rumen..... | 63 |
| 6.4.1. Efecto de la concentración de lovastatina sobre alfa diversidad | 63 |
| 6.4.2. Efecto de la concentración de lovastatina sobre la beta diversidad | 64 |
| 6.4.3. Efecto de la concentración de lovastatina sobre la abundancia relativa de la microbiota ruminal..... | 66 |
| 6.4.4. Correlación de Spearman entre la microbiota ruminal y los metabolitos finales de fermentación ruminal | 69 |
| 6.5. Actividad 5. Inhibición <i>in vitro</i> de metano en bovinos productores de leche..... | 72 |
| 6.5.1. Producción de ácidos grasos volátiles | 73 |
| 6.5.2. Remoción de lovastatina | 75 |
| 7. Conclusión..... | 78 |

8. Referencias81

9. Anexos.....90

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal <i>in vitro</i> | 15 |
| Cuadro 2. Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal y digestibilidad de la materia seca en experimentos <i>in vivo</i> | 17 |
| Cuadro 3. Ingredientes, proporción de rastrojo de avena fermentado y composición química de las dietas experimentales | 30 |
| Cuadro 4. Programa de temperatura (GC) para determinar ácidos grasos volátiles | 32 |
| Cuadro 5. Índices Illumina correspondientes de cada muestra | 39 |
| Cuadro 6. Análisis bromatológico de los sustratos de fermentación en estado sólido..... | 47 |
| Cuadro 7. Composición de pared celular y eficiencias de degradación de 'celulosa + hemicelulosa' y lignina de <i>A. terreus</i> CDBB H-194..... | 48 |
| Cuadro 8. Composición bromatológica de las dietas experimentales con rastrojo de avena fermentado | 52 |
| Cuadro 9. Efecto del rastrojo de avena fermentado como portador de lovastatina sobre la producción total de gas, metano y ácidos grasos volátiles | 54 |
| Cuadro 10. Efecto de la lovastatina, monensina sódica y ácido bromoetano sulfónico sobre la fermentación ruminal <i>in vitro</i> | 59 |
| Cuadro 11. Abundancia relativa de bacterias y arqueas del rumen en el inoculo, control, y rastrojo de avena fermentado (Lv 150 mg/L)..... | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la fermentación ruminal de carbohidratos | 4 |
| Figura 2. Ruta metanogénica a partir de la reducción de CO ₂ con H ₂ | 7 |
| Figura 3. Hidrólisis de lovastatina y similaridad entre las estructuras químicas de la lovastatina β-Hidroxiácido y la HMGCoA. (a) lovastatina lactona, (b) lovastatina β-Hidroxiácido, (c) HMGCoA, y (d) Mevalonato | 9 |
| Figura 4. Biosíntesis y composición de la membrana de arqueas. (a) Ruta del Mevalonato para producir lípidos isoprenoides de la membrana de las arqueas metanogénicas; (b) Mecanismo inhibitorio de la lovastatina sobre la HMG-CoA reductasa, enzima limitante y responsable de la conversión de la HMG-CoA a Mevalonato | 12 |
| Figura 5. Diagrama de trabajo de las etapas y actividades del proyecto doctoral..... | 23 |
| Figura 6. Producción de lovastatina en FES: (a) <i>A. terreus</i> CDBB H-194 y (b) <i>A. terreus</i> CDBB H-1976. □, rastrojo de avena; △, salvado de trigo. Los datos representan la media ± desviación estándar. Los asteriscos en líneas indican significancia de acuerdo con la prueba de Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$)..... | 50 |
| Figura 7. Cromatogramas HPLC de (a) Lv sin hidrolizar. (b) Lv hidrolizada. Los picos representan: L, en forma lactona y H, Lv forma β-hidroxiácido | 56 |
| Figura 8. Producción de gas total ruminal <i>in vitro</i> de una dieta para bovinos de carne alta en grano. □ control; △ ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ○, monensina (6 mg/L); ◇ lovastatina (300 mg/L) | 57 |
| Figura 9. Producción de metano ruminal <i>in vitro</i> de una dieta al en grano para bovinos de carne. □ control; △ ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ○, monensina (6 mg/L); ◇ lovastatina (300 mg/L) | 58 |
| Figura 10. Índices de diversidad alfa de los siguientes tratamientos: inoculo, control, y RAF concentración de lovastatina (150 mg/L)..... | 63 |
| Figura 11. Beta diversidad. A) Análisis de componentes principales derivado de la distancia ponderada UniFrac entre los tratamientos: inoculo, azul; control, rojo; y RAF (Lv 150 mg/L), verde. B) Diagrama de Venn. C) Porcentaje de variación explicado por componente | 65 |
| Figura 12. Abundancia relativa de arqueas y bacterias a nivel de filo de los tratamientos: inoculo, control, y RAF concentración de lovastatina (150 mg/L)..... | 66 |
| Figura 13. Correlación de Spearman entre la microbiota ruminal y los metabolitos finales de fermentación | 71 |

Figura 14. Producción de metano a 72 h incubación de una dieta para bovinos productores de leche (negro), dieta para bovinos productores de leche + Lv 300 mg/L (azul fuerte); celulosa (gris), celulosa + Lv 300 mg/L (azul claro). Los resultados expresan la media \pm D.E. * Indica diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$) 72

Figura 15. Producción de ácidos grasos volátiles de una dieta para bovinos productores de le leche (negro) y de la dieta para bovinos productores de leche + Lv 300 mg/L (blanco). Los resultados expresan la media \pm D.E. *Indica diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$)..... 73

Figura 16. Proporción de ácidos grasos volátiles, celulosa (negro) y celulosa + Lv 300 mg/L (blanco). Los resultados expresan la media \pm D.E. * Indica diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$) 74

Figura 17. Remoción de Lv (300 mg/L) con dieta para bovinos productores de leche (azul fuerte) y celulosa (azul claro) como sustratos de fermentación ruminal. Los resultados se expresan como la media \pm D.E..... 75

Figura 18. Degradación microbiana y metabolitos derivados de la lovastatina usando un modelo de colon a nivel *in vitro* con heces de seres humanos como inóculo (Aura *et al.*, 2011 76

NOTACIÓN

| | |
|--------------|--|
| AGV | ácidos grasos volátiles |
| AM | arqueas metanogénicas |
| BES | ácido bromoetano sulfónico |
| CH=H4MPT | metil tetrahidrometanopterina |
| CH2=H4MPT | metil tetrahidrosarcinopterina deshidrogenasa |
| CH3-H4M(S)PT | metil transferasa |
| CH3-SCoM | metil coenzima M |
| CHO-MF | formil metanofurano |
| CoMS-SCoB | reducción del disulfuro de la coenzima M y la coenzima B |
| EE | extracto etéreo |
| ESSF | eficiencia de fermentación en estado sólido |
| F420 | coenzima F420 |
| Fd | ferredoxina |
| FDA | fibra detergente ácido |
| FDN | fibra detergente neutro |
| FES | fermentación en estado sólido |
| GEI | gases de efecto invernadero |
| H4M(S)PT | tetrahidrosarcinopterina |
| H4MPT | tetrahidrometanopterina |
| HI | β -hidroxiácido |
| HSCoB | coenzima B |
| HSCoM | coenzima M |
| LA | lactona |
| LSD | least significant difference |
| Lv | lovastatina |
| MF | metanofurano |
| MON | monensina |
| MS | materia seca |
| PC | proteína cruda |

| | |
|-----|-------------------------------------|
| PCA | análisis de componentes principales |
| PGT | producción de gas total |
| PV | peso vivo |
| RAF | rastrojo de avena fermentado |
| UTO | unidad taxonómica operacional |

Letras griegas

| | |
|----------------|---|
| $\eta_{(c+h)}$ | eficiencia de degradación de 'celulosa + hemicelulosa' |
| η_{lig} | eficiencias de degradación de 'lignina' |
| ε | relación de $\eta_{lig} / \eta_{(c+h)}$ |
| Y_{ji} | contenido inicial de lignina o de 'celulosa + hemicelulosa' |
| Y_{jf} | contenido final de lignina o de 'celulosa + hemicelulosa' |

RESUMEN

El metano derivado de la fermentación entérica es el gas con mayor impacto ambiental emitido por los rumiantes, su contribución a nivel mundial es alrededor de un tercio de las emisiones antropogénicas. Además, se considera que alrededor del 2 al 12 % de la energía consumida por los rumiantes se puede metabolizar a metano. La lovastatina (Lv) es un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, enzima limitante en la biosíntesis de poliprenoles, los cuales son importantes para mantener la función y estructura de la membrana de las arqueas metanogénicas (MA). Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar los efectos *in vitro* de Lv sobre la inhibición de la producción de metano, otros productos finales de fermentación, y la microbiota ruminal.

La investigación se dividió en tres fases. En la Etapa 1, se evaluó la producción de Lv en fermentación en estado sólido (FES) y su efecto sobre la mitigación de metano ruminal *in vitro*. Además, se comparó el efecto de Lv pura contra la monensina (MON) y el ácido bromoetano sulfónico (BES) sobre la inhibición de metano ruminal y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). Durante la Etapa 2, se realizó secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA de las muestras de tratamientos anti metanogénicos que usaron rastrojos de avena fermentado (RAF) como portador de Lv. También se analizó el efecto de la Lv pura con una dieta e inóculo de bovinos productores de leche. Adicionalmente, se evaluó la remoción de Lv bajo estas condiciones. En la Etapa 3, se realizó el análisis bioinformático y de estadística multivariada.

Los resultados demostraron que la FES del rastrojo de avena con la cepa *A. terreus* CDBB H-194 a los 16 días obtuvo el mayor rendimiento de Lv 23.8 mg/g MS. Posteriormente, la suplementación del RAF como portador de Lv en una dieta alta en grano sugirió que se requiere menos de 20 % de RAF en una dieta para alcanzar hasta 38 % de mitigación de metano ruminal *in vitro*. El perfil de metabolitos finales de fermentación ruminal resultó en un decremento de la producción total de AGV, pero indujo a un incremento significativo en la proporción molar de propionato respecto al control.

Por otra parte, la Lv pura (>97 %) demostró efectos alentadores sobre la mitigación de metano ruminal (43.56 %), sin afectar la producción total y perfil de AGV. No obstante, la dosis para obtener este resultado fue muy alta en comparación con otros tratamientos (MON y BES). En este contexto, 72 % de Lv fue removida en condiciones de cultivo anaerobio con inóculo ruminal y una dieta para bovinos durante incubaciones a corto plazo (3 días).

La caracterización de comunidades microbianas indicó que el tratamiento RAF (Lv, 150 mg/L) no tuvo efectos significativos sobre los índices de alfa y beta diversidad. Sin embargo, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en la abundancia relativa de algunos microorganismos, un incremento en el género *Ruminococcus* y una disminución en el género *Prevotella* asociadas al tratamiento RAF. Las AM predominantes (99 %) en todas las muestras pertenecieron al género *Methanobrevibacter*. Interesantemente, los datos obtenidos muestran que la reducción de la abundancia relativa del filo *Euryarchaeota* (39.17 %) fue muy cercana a la mitigación de la producción de metano ruminal (38 %).

ABSTRACT

Methane from enteric fermentation is the gas with the greatest environmental impact emitted by ruminant livestock and contributed almost one-third of global anthropogenic emissions. Also, it is considered that around 2 to 12 % of the total energy consumed by ruminants can be metabolized to CH₄. Lovastatin (Lv) is an inhibitor of the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase. The latter is the rate-limiting enzyme for the mevalonate pathway and is required for the biosynthesis of polyprenols which have a significant role in maintaining the membrane structure of the methanogenic archaea (MA).

Therefore, the objective of this thesis was to assess the *in vitro* effects of Lv on methane inhibition, fermentation end-products, and rumen microbiota.

The investigation was divided into three phases. In Stage 1, the Lv production by solid state fermentation (SSF) and its effects on the *in vitro* rumen methane production were evaluated. Another experiment was carried out to determine the effect of pure Lv on *in vitro* methanogenesis and volatile fatty acids production (VFA) in comparison with monensin (MON) and bromoethane sulfonic acid (BES). During Stage 2, selected samples of *in vitro* trials with fermented oat straw (FOS) as Lv-carrier were examined using V4 region of 16 rRNA gene amplicon sequencing. Additionally, the anti-methanogenic effect of pure Lv was assessed with rumen inoculum and a diet from dairy cattle as well as the degradation of Lv under these conditions. In Stage 3, bioinformatic and multivariate statistical analysis were performed.

The results showed that the SSF of oat straw with the *A. terreus* CDBB H-194 strain at 16 d of incubation time gave the highest lovastatin yield (23.8 mg/g DM). Then, the supplementation of fermented oat straw (FOS) as a Lv-carrier to a high grain diet suggested that less than 20 % of FOS was required in the ration to achieve up to 38 % of methane mitigation. The rumen VFA profile resulted in a decrease in the total production, but the FOS treatment induced a significant increase in the molar proportion of propionate with respect to the control.

On the other hand, pure Lv treatment (> 97 %) demonstrated promising effects on rumen fermentation pattern in terms of methane mitigation (43.56 %) without affecting the VFA production. However, the dose of pure Lv to obtain this result was very high compared to MON and BES treatments. In this context, 72 % of Lv was removed under anaerobic culture trials that used ruminal inoculum and a bovine diet during short-term incubations (3-d).

The characterization of microbial communities suggested that the FOS treatment (Lv, 150 mg/L) did not result in significant differences in the alpha and beta diversity indices compared to the control. However, significant changes in the relative abundance of some microorganisms were detected, such as an increase in *Ruminococcus* and a decrease in *Prevotella*. The predominant MA (99 %) in all samples belonged to the *Methanobrevibacter* genus. Interestingly, the reduction of relative abundance of MA was (39.17 %) very close to the percent reduction of CH₄ production (38 %).

1. Introducción

Recientemente, la contribución de los rumiantes a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) ha tomado amplia relevancia. Estos gases se producen mayormente de la fermentación entérica ruminal (Herrero *et al.*, 2016). El metano es el gas con mayor impacto ambiental emitido por los rumiantes y después del CO₂, es el gas de efecto invernadero (GEI) más abundante. El poder de calentamiento global del CH₄ es 28 a 84 veces mayor al CO₂, en escala de 100 y 20 años, respectivamente (Myhre *et al.*, 2013) y tiene un periodo de vida atmosférico de 12.4 años (Sauniois *et al.*, 2020). Se ha estimado que las emisiones de metano ruminal y derivados del manejo de heces para el periodo 2008 - 2017 fueron de 11 Tera gramos CH₄/ año, lo que contribuyó con un tercio de las emisiones globales antropogénicas de metano (Sauniois *et al.*, 2020). Por otra parte, se considera que el CH₄ representa una pérdida alrededor de 2 al 12 % del total de la energía consumida en los alimentos por los rumiantes (Johnson y Johnson, 1995).

A su vez, las emisiones a nivel mundial de GEI provenientes del sector ganadero en el periodo de 1995 a 2005, fueron de entre 5.6 y 7.5 Giga toneladas de CO₂ equivalente por año. Esto representa ~ 14.5 % del total de las emisiones antropogénicas de GEI (Herrero *et al.*, 2016). En México para el año 2015, de acuerdo con el Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero (INECC, 2018) los rumiantes domésticos (bovinos, ovinos y caprinos) produjeron 52,562 Giga gramos de CO₂ equivalente derivado de la fermentación ruminal.

En general, los principales productos de la fermentación ruminal son ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana, éstos se absorben en el sistema digestivo y se incorporan al metabolismo del animal hospedero (Krause *et al.*, 2003). No obstante, algunos

metabolitos finales de la fermentación como el CO₂ e H₂ no se absorben en rumen. En este caso, el H₂ es utilizado para reducir el CO₂ a CH₄ por arqueas metanogénicas (AM), este último es eructado por el animal a la atmosfera (Tapio *et al.*, 2017).

Por esta razón, se han evaluado distintas estrategias para mitigar las emisiones de metano entérico ruminal. Inicialmente con prácticas de nutrición animal mediante suplementación de lípidos, dietas con mayor contenido de granos, y forrajes de mejor calidad (Beauchemin *et al.*, 2020). También destacan algunos fitocompuestos como los metabolitos secundarios de las plantas (*e.g.* saponinas, taninos, flavonoides) los cuales han sido evaluados ampliamente (Patra *et al.*, 2017).

Por otra parte, se encuentran los inhibidores enzimáticos de la metanogénesis, los cuales se pueden dividir en: (i) análogos de la coenzima M: ácido bromoetanosulfónico, 2-cloroetanosulfonato y 3-nitroxipropanol (Liu *et al.*, 2011); (ii) inhibidores de la 3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa: lovastatina (Lv) y mevastatina (Miller y Wollin 2001). La HMGC_oA reductasa es una enzima clave para la reducción de la HMGC_oA a mevalonato, ésta última es la ruta de síntesis de isoprenoides, los cuales conforman la membrana de las AM (Gottlieb *et al.*, 2016). Así, la Lv podría ser una estrategia para mitigar la producción de CH₄ ruminal. Sin embargo, los resultados asociados a este inhibidor metanogénico son escasos y no existe un juicio general sobre la mitigación de metano ruminal *in vitro*.

1.1. Fermentación ruminal

El rumen es el compartimiento más grande del sistema digestivo de los rumiantes. Este sistema de fermentación continua permite la entrada alimentos y remoción de la parte no digerible de estos, así como también la absorción de metabolitos. Las principales

condiciones del ecosistema ruminal se presentan a continuación (Kumar *et al.*, 2015; Nagaraja, 2016):

1. Suministro contínuo de alimento y de agua que mantiene un constante contenido de materia seca (MS) 10-18 %.
2. Reducción del tamaño del alimento mediante la masticación y la rumia.
3. Temperatura (38 – 42 °C) ideal para el crecimiento de hongos, bacterias, protozoarios y AM.
4. pH de 5.5 - 7.0, este intervalo se mantiene debido a la secreción de bicarbonato en la saliva, así como también por la absorción de los AGV en el epitelio ruminal.
5. Anaerobiosis, el potencial redox es de 150 – 300 mV.
6. Osmolaridad (250-350 mOsm / kg), la cual se mantiene a través de intercambio del fluido ruminal con el fluido sanguíneo
7. Suplementación y recirculación de nutrientes (urea y fósforo) vía saliva y también de la difusión mediante las paredes del rumen, además de la presencia de factores de crecimiento microbiano (aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga, purinas y pirimidinas).
8. Remoción de productos finales de fermentación mediante eructos (CO₂, 65 %; CH₄, 27 %; N₂, 7 %) y por difusión atenuada de los AGV al torrente sanguíneo.

Normalmente, los alimentos que consumen los rumiantes tienen alto contenido lignocelulósico, las bacterias y hongos degradan parte de la materia orgánica a monómeros, posteriormente éstos son fermentados a AGV, H₂, CO₂, y CH₄ (Weimer, 1998; Owens Basalan, 2016). Las rutas metabólicas implicadas en la fermentación de carbohidratos se muestran en la figura 1.

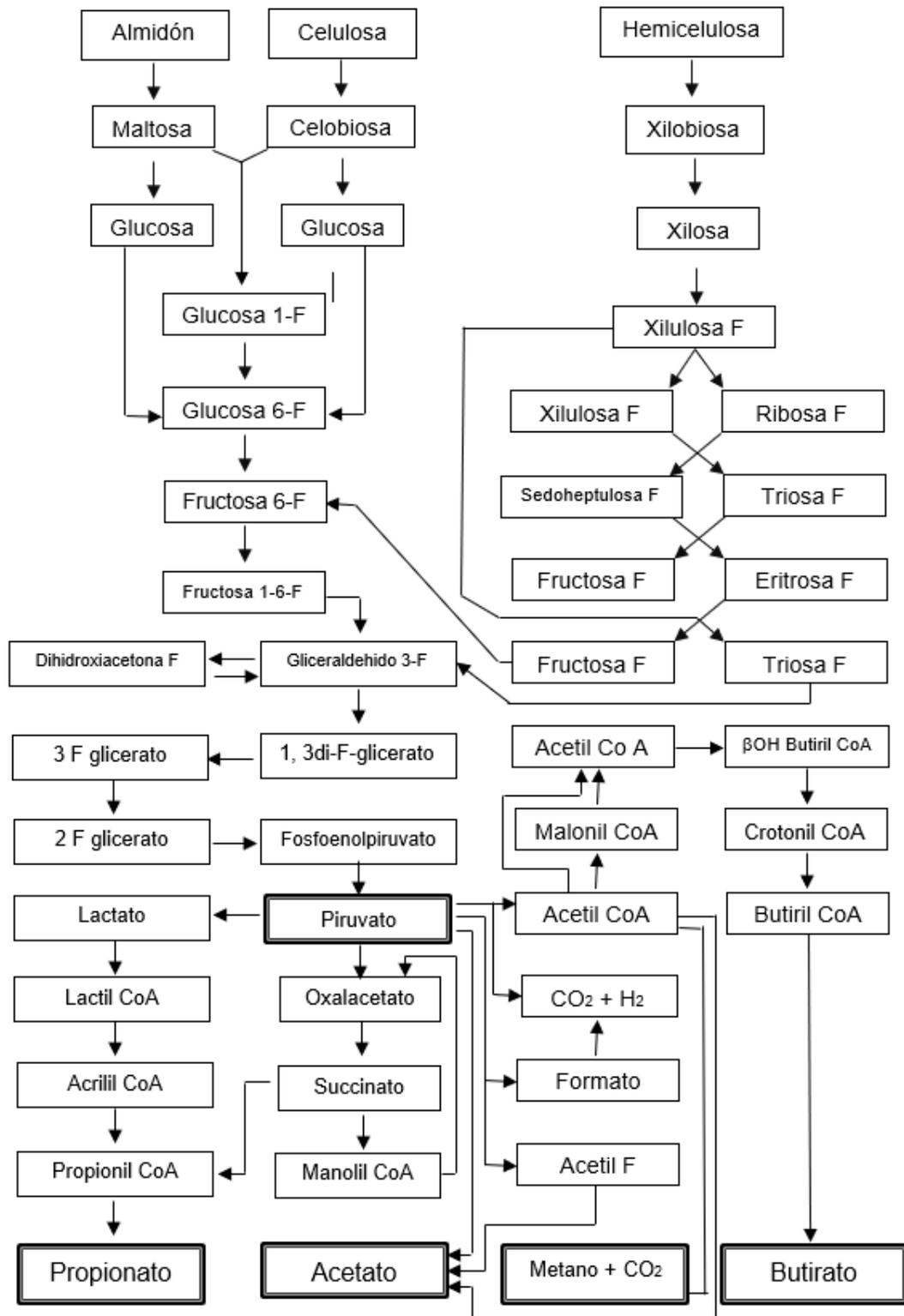


Figura 1. Las rutas metabólicas implicadas en la fermentación ruminal de carbohidratos (adaptada de van Houtert, 1993).

Los microorganismos del rumen secretan distintas celulasas (endo β -1,4-glucanasa, exo β -1,4-glucanasa y β -1,4 glucanasa), las cuales en sinergia descomponen la celulosa en oligosacáridos y posteriormente son hidrolizadas a glucosa (Lian *et al.*, 2020).

La hemicelulosa es degradada a xilano por enzimas endo y exo xilanasas (Dodd *et al.*, 2010) principalmente de bacterias del género *Celulomonas*, *Fibrobacter*, y *Ruminococcus*, así como por hongos del género *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, y *Piromyces* (Lian *et al.*, 2020).

El almidón es degradado rápidamente a glucosa, glucosa 1 fosfato, maltosa, y cadenas lineales de α 1-4 glucanos por enzimas (e.g. α amilasa, β amilasa, polulanasa) de bacterias amilolíticas, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium*, *Prevotella ruminicola* (Gómez *et al.*, 2016; Harlow *et al.*, 2017).

En el rumen, el 90 % de las hexosas son metabolizadas a piruvato por vía glucolisis, mientras que otras moléculas de glucosa utilizan la ruta de las pentosas (Ungerfeld, 2020). A partir del piruvato se forman metabolitos finales como el acetato, propionato y butirato (van Houtert, 1993; Owens y Basalan, 2016).

La conversión de piruvato a acetil-CoA es un paso sobresaliente (Figura 1), debido a que los electrones generados se utilizan para formar productos de fermentación (acetato y butirato), o liberarse como hidrógeno metabólico (Ungerfeld, 2020). De esta manera, la presencia de aceptores o donadores de electrones producidos durante la fermentación es uno de los factores que más influyen sobre la ruta del piruvato en la conversión a los principales AGV. Para continuar con el metabolismo de los carbohidratos se requiere que ciertos cofactores se re oxiden. La hidrogenasa transfiere e^- desde la ferredoxina, $2 H^+$ formando H_2 (Greening *et al.*, 2019).

La producción de acetato a partir del piruvato es la ruta predominante del rumen, pero también se puede formar fosfato de acetilo, formiato, H₂ y CO₂. El propionato se puede obtener del piruvato o del lactato, pero es más común del succinato. El butirato es cuantitativamente el AGV de menor proporción, y se sintetiza del acetato o del piruvato (van Houtert, 1993).

A diferencia de la formación de acetato y butirato que involucran la producción de hidrógeno para su síntesis, la formación de propionato consume H₂, por lo tanto, compite con la metanogénesis por el H₂ (Ungerfeld, 2015).

1.2. Metanogénesis ruminal

La mayor producción de metano (87 %) en los rumiantes se lleva a cabo en el rumen (Murray *et al.*, 1976), por metanógenos que pertenecen al dominio, *Archaea*; filo, *Euryarcheota*; orden, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, y *Methanopyrales* (Ferry, 2010). Cabe resaltar que las cepas *Methanobrevibacter gottschalkii* y *Methanobrevibacter ruminantium* comprenden el 74 % de las AM del rumen (Henderson *et al.*, 2015), éstas reducen el CO₂ a CH₄ con electrones del H₂ como principal ruta metanogénica (Ferry, 2011) por lo tanto, se mencionará únicamente esta ruta (Figura 2).

Primero, el CO₂ se activa con la enzima metanofurano (MF) y se reduce a formilo (el donador de electrones es la ferredoxina). Esta reacción es endergónica catalizada por el gradiente electroquímico a través de la membrana citoplasmática (Ferry, 2010).

Durante el segundo paso, el grupo formil (CHO) del CHO-MF es transferido a la tetrahidrometanopterinina (H4MPT), el cual es reducido a formil tetrahidrometanopterinina (CHO-H4MPT) [Fig. 2, reacción 2].

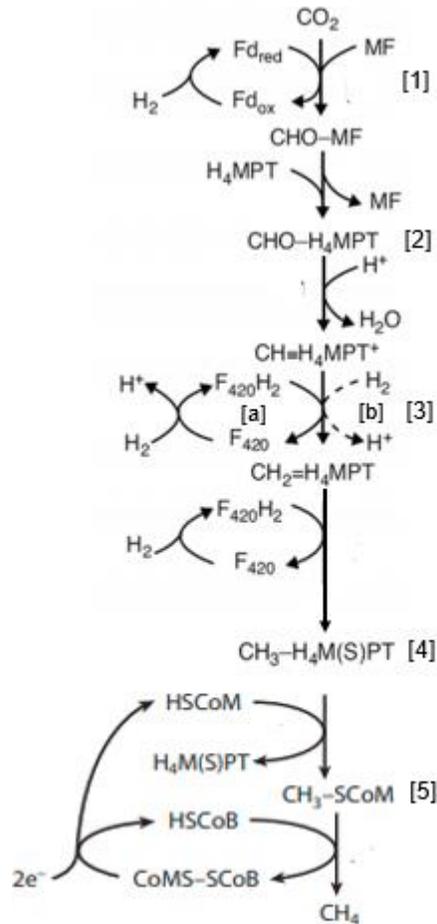


Figura 2. Ruta metanogénica a partir de la reducción de CO_2 con H_2 (adaptada de Ferry 2011). Notación: Fd, ferredoxina; MF, metanofurano; CHO-MF, formilmetanofurano; H_4MPT , tetrahidrometanopterina; $\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}$, metil tetrahidrometanopterina; F_{420} , coenzima F_{420} ; $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$, metil tetrahidrosarcinopterina deshidrogenasa; $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{M(S)PT}$, metil transferasa; HSCoM , coenzima M; $\text{H}_4\text{M(S)PT}$, tetrahidrosarcinopterina; $\text{CH}_3\text{-SCoM}$, metil coenzima M; HSCoB , coenzima B; CoMS-SCoB , reducción del disulfuro de la coenzima M y la coenzima B.

Posteriormente, el grupo metilo de la metil tetrahidrometanopterina ($\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}$) se transfiere desde la metanopterina a la Coenzima M (HS-CoM). Esta reacción exergónica está acoplada a la formación gradiente de iones de sodio [Fig. 2, reacción 3]. A continuación, se lleva cabo dos reducciones, la F_{420} dependiente de la enzima Metil- $\text{H}_4\text{M(S)PT:CoM}$ transferasa (Mtr) cataliza la reacción 3a, y la enzima metil H_4MPT deshidrogenasa

independiente de la coenzima F420 (Hmd) cataliza la reacción 3b (Figura 2) donde utilizan H₂ como donador de electrones, la Mtr se utiliza en la reacción 4, lo cual culmina con CH₃-H4M(S)PT (Ferry 2010).

La H4M(S)PT es transferida a la HS-CoM seguido de la desaminación reductiva de la CH₃-S-S-CoB a CH₄ con electrones donados de la HS-CoB [Fig. 2, reacción 5]

La HS-CoB funciona como donador de electrones para la reducción de metil-S-CoM (HSCoM) en la reacción final, la cual es catalizada por la metil-CoM reductasa [Fig. 2 reacción 5], lo que finalmente produce CH₄ (Ferry, 2011).

De tal manera que un mol de CO₂ es reducido a CH₄ como se muestra la siguiente ecuación (Ec.1) (Ferry, 2010):



Cabe resaltar algunas de las coenzimas involucradas en la metanogénesis: la F₄₂₀, acarreador central de electrones en el citoplasma de metanógenos; la Coenzima B, donador de electrones en el último paso de la metanogénesis; la Coenzima M, MF y la H4MPT son portadores de grupos carbono (C1) intermediarios en la metanogénesis (Deppermeier y Muller, 2007).

1.3. Clasificación y estructura de las estatinas

Las estatinas se clasifican en tres categorías: (i) estatinas naturales, producidas principalmente por hongos, por ejemplo, Lv y prevastatina, (ii) estatinas semisintéticas, éstas son derivadas de las estatinas naturales mediante síntesis química como la simvastatina, y (iii) estatinas sintéticas, las cuales no son producidas biológicamente o por

la síntesis química de las estatinas naturales, e.g., rosuvastatina, pitavastatina, atorvastatina, fluvastatina, y cerivastatina.

Las estatinas tienen en común la siguiente subestructura, un quiral β -hidroxi- γ -lactona o su análogo en forma abierta, el ácido 3,5,-sin-diol, con dos estereocentros (Kajdič *et al.*, 2019; Figura 3).

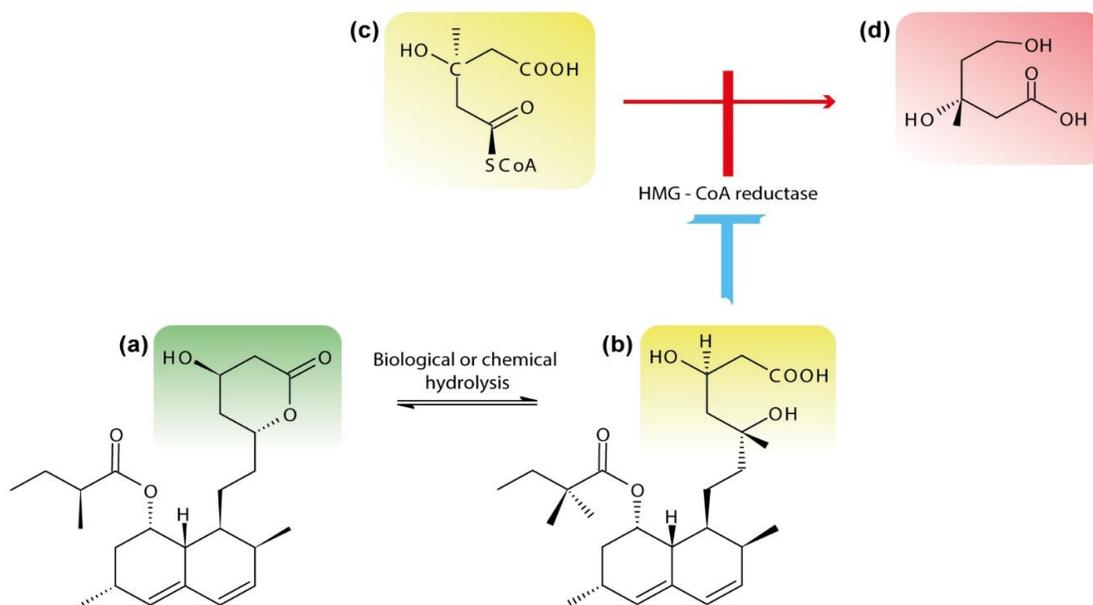


Figura 3. Hidrólisis de lovastatina y similaridad entre las estructuras químicas de la lovastatina β -Hidroxiácido y la HMGCoA. (a) lovastatina lactona, (b) lovastatina β -Hidroxiácido, (c) HMGCoA, y (d) Mevalonato. Adaptado de Syed y Ponnisamy (2018).

La fórmula empírica de la Lv es $C_{24}H_{36}O_5$, tiene un peso molecular de 404.5 g/mol, y es casi insoluble en agua 0.4 mg/L (Goswani *et al.*, 2012). La Lv exhibe solubilidad moderada en metanol, etano, acetonitrilo, y es altamente soluble $CHCl_3$ (Ying *et al.*, 2018).

La Lv pura se comercializa en su forma lactona (LA) “pre-fármaco inactivo”, la cual es insoluble en agua y con gran capacidad para atravesar las membranas biológicas (Zhang *et*

al., 2015; Kajdič *et al.*, 2019). No obstante, existen algunas formas para activarla en su forma activa β -hidroxiácido (HI), la cual es soluble en agua (Yang *et al.*, 2006; Figura 3).

1.4. La lovastatina como estrategia para inhibir las arqueas metanogénicas

Las membranas de las AM y eubacterias están formadas por una bicapa o monocapa de moléculas de lípidos que forman una matriz en la que se encuentran varias proteínas (Konings *et al.*, 2002). A diferencia de eubacterias y eucariotas, las arqueas tienen cadenas laterales de isoprenoides unidas al glicerol mediante enlaces de tipo éter (Sûstar *et al.*, 2012). Algunas arqueas contienen lípidos en su membrana donde la unidad fundamental puede sufrir una dimerización intermolecular formando un par de hidrocarburo isoprenoide C40 ligado a di glicerol. Las arqueas sintetizan lípidos isoprenoide unidos por enlace éter, característica única de este dominio (Figura 4a), los cuales forman la unidad estructural de sus membranas (Knappy *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, una estrategia para inhibir el crecimiento de AM es mediante el uso de compuestos que inhiban una etapa clave en la síntesis de unidades isoprenoide.

Las estatinas se pueden producir del metabolismo secundario de hongos filamentosos, los principales productores son *Aspergillus terreus* y algunas especies del género *Monascus* (Goswami *et al.*, 2012; Bizukojc y Gonciarz, 2015). La Lv es una estatina, que en su forma β hidroxiácido es un inhibidor competitivo de la HMGCoA reductasa, enzima que realiza la conversión de HMGCoA en ácido mevalónico (Figura 4b). Esto último a su vez es el paso limitante en la síntesis de pirofosfato de isopentenilo, precursor de moléculas importantes como: colesterol, unidades de isopreno, terpenos, etcétera (Suzuki y Imai, 2010).

Como se describió, las AM contienen cadenas largas de isoprenoides como componente principal de su membrana celular, las cuales son sintetizadas a partir de mevalonato, este es el precursor clave para la síntesis de isoprenoides en AM. Lv inhibe la HMGC_oA así disrumpe la síntesis de la membrana celular, impide la cadena respiratoria de la metanogénesis unida a la membrana y afecta negativamente el crecimiento de metanógenos (Miller y Wolin, 2001; Gottlieb *et al.*, 2016).

Otro mecanismo mediante el cual la Lv podría inhibir las AM, es a través de la inhibición de enzimas que participan en la reducción del CO₂ durante la metanogénesis, específicamente aquellas que requieren de la coenzima F₄₂₀ (Sharma *et al.*, 2011).

Experimentos de acoplamiento de proteína-ligando *in silico* sugieren que la Lv puede tener una mayor afinidad por el sitio de unión a la F₄₂₀ en este tipo de enzimas que la misma coenzima F₄₂₀. Esta coenzima se une como grupo prostético al sitio activo de la enzima como normalmente ocurre en la naturaleza. Sin embargo, un estudio de predicción de inhibidores reveló que la Lv tiene una afinidad de reacción de -22.07 Kcal/mol y la mevastatina una afinidad de reacción de -21.91 kcal/mol. Esto indica que existe mayor afinidad por la estructura modelo de la enzima oxidorreductasa NADP en comparación con el de la coenzima F₄₂₀, la cual tan solo mostró una afinidad de reacción de -14.40 Kcal/mol. A su vez, esto sugiere que la Lv y la mevastatina pueden actuar como inhibidores potenciales de la proteína oxidorreductasa NADP dependiente de F₄₂₀ alterando los pasos de la ruta metanogénica en los que se encuentre involucrada la coenzima F₄₂₀ (Sharma *et al.*, 2011). Sin embargo, la evidencia experimental de este mecanismo alternativo es muy limitada (Muskal *et al.*, 2016).

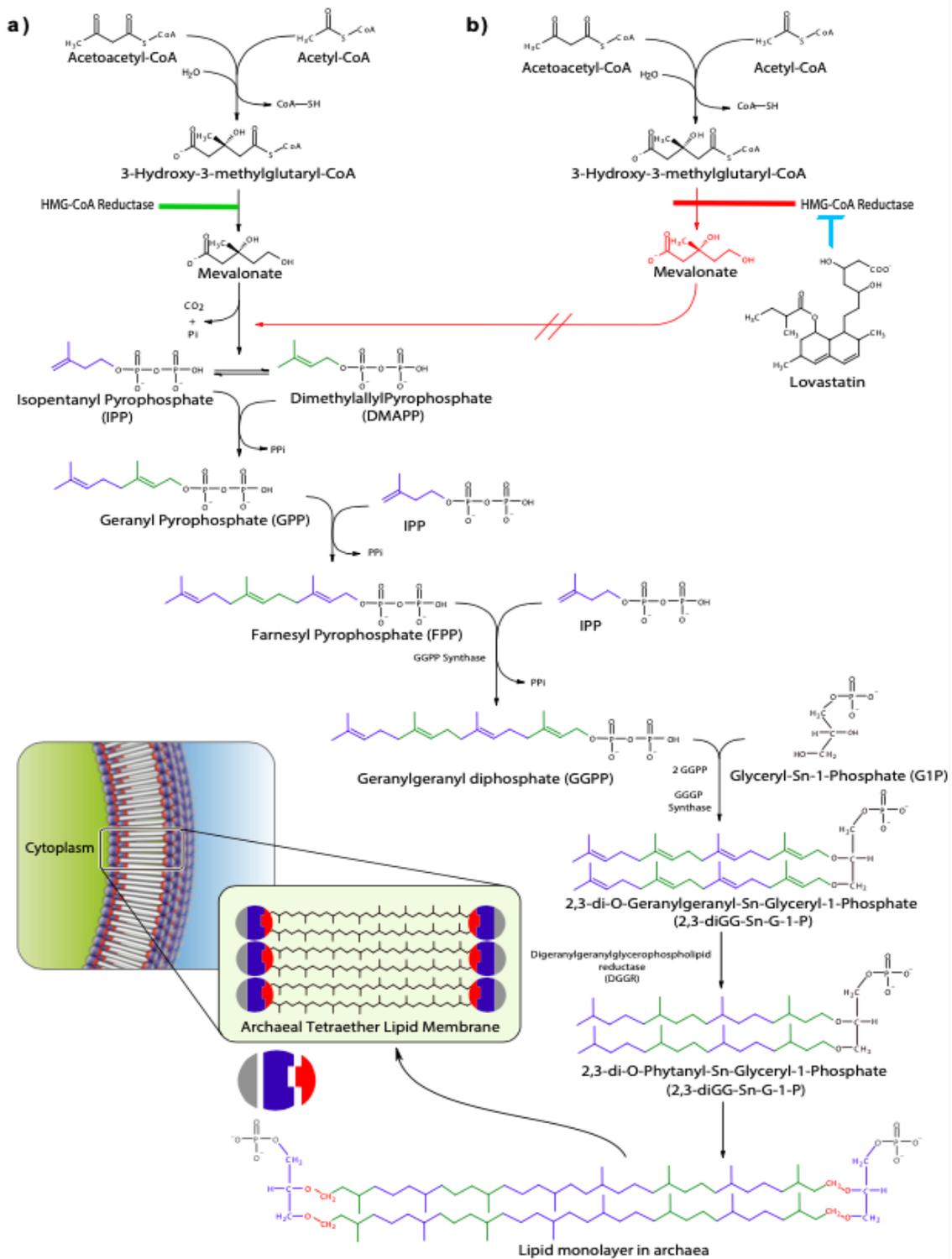


Figura 4. Biosíntesis y composición de la membrana de arqueas metanogénicas. (a) Ruta del Mevalonato para producir lípidos isoprenoides de la membrana de las arqueas; (b) Mecanismo inhibitorio de la lovastatina sobre la HMG-CoA reductasa, enzima responsable de la conversión de la HMG-CoA a Mevalonato. Adaptada de Jain *et al.* (2014).

1.5. Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal

Una limitante de la Lv en la alimentación de rumiantes es su costo (7.5 USD \$/g grado industrial, Mulder *et al.*, 2018, Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Por lo tanto, se han evaluado algunas alternativas económicas para producir Lv, entre las cuales, la FES es uno de los bioprocesos más promisorios.

Una ventaja de la FES aplicado a la nutrición animal radica en los sustratos, los cuales una vez fermentados pueden ser utilizados como portadores de Lv, y posteriormente incorporarse a las raciones para rumiantes como suplementos anti metanogénicos (Jahromi *et al.*, 2013, Morgavi *et al.*, 2013, Ábrego-García *et al.*, 2021).

Se han evaluado diferentes residuos y productos agrícolas para producir Lv mediante FES, pero en este apartado solo se menciona brevemente los resultados de experimentos donde los rastrojos fermentados fueron usados para mitigar la metanogénesis ruminal. Interesantemente, todas las cepas valoradas pertenecen a *Aspergillus terreus*. En la FES del rastrojo de avena se obtuvo rendimientos de 0.26 y 0.69 mg/g MS Jahromi *et al.* (2013) y Mohd Azlan *et al.* (2018), respectivamente. A pesar del alto contenido de fibra en el rastrojo de arroz, los resultados con base en la producción de Lv son similares a los obtenidos en grano de arroz 0.57 mg/g MS (Morgavi *et al.*, 2013). Otro sustrato de FES fue la torta de palmiste, en la cual se tuvo un rendimiento máximo de 0.85 mg/g DM (Candyrine *et al.*, 2018) y finalmente, en el rastrojo de avena con el rendimiento de Lv más alto 23.8 mg/g MS (Ábrego-García *et al.*, 2021). En general, estos resultados sugieren un rendimiento de bajo a moderado de Lv en comparación con experimentos dirigidos especialmente a producir estatinas (Mulder *et al.*, 2015).

1.5.1. Experimentos *in vitro*

Se ha demostrado que la Lv tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de CH₄ en cultivos puros de AM. El Cuadro 1 reúne la información sumaria de los antecedentes relevantes. El trabajo pionero de Miller y Wolin (2001) demostró que la adición de Lv (4 µg/mL) en medios anaerobios con cepas del género *Methanobrevibacter* aisladas del rumen, en co-cultivo con bacterias fibrinolíticas/celulolíticas disminuyó 80 a 100 % el crecimiento de las cepas *Methanobrevibacter* y redujo significativamente su producción de CH₄. Estos resultados fueron confirmados por Demonfort *et al.* (2017) quienes en cultivos puros de AM y bacterias del sistema digestivo de humanos inhibieron completamente la metanogénesis con Lv (4 µg/mL). Por su parte, Jahromi *et al.* (2013b) en un experimento bajo condiciones similares a los anteriores reportaron que la cepa *Methanobrevibacter smithii* tuvo una inhibición de metano (96 %) con una dosis 12 veces mayor de Lv (50 µg/mL).

Lamentablemente, los resultados asociados al efecto anti metanogénico de la Lv pura en fermentaciones de consorcios microbianos ruminales y sustratos complejos (dietas para rumiantes) a nivel *in vitro* son inconsistentes (Cuadro 1). Primero, dosis bajas de Lv pura (< 5 mg/L) no muestran efecto inhibitorio de la Lv sobre la metanogénesis ruminal (Busquet *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2014). En contraste, dosis mayores de 100 mg Lv/L confirman un efecto significativo sobre la mitigación de CH₄ ruminal (Soliva *et al.*, 2011; Joch *et al.*, 2021).

Por otra parte, los resultados de fermentaciones ruminales donde se evaluaron los rastrojos agrícolas como portadores de Lv sugieren inhibiciones significativas de metano a un rango más amplio respecto a la dosis de Lv (Jahromi *et al.*, 2013; Khonkhaeng y Cherdthong, 2020; Ábrego-García *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal *in vitro*

| Objetivo | Animal donador y dieta experimental | Descripción de la técnica <i>in vitro</i> | Dosis Lv (mg/L) | Inhibición de metano (%) | DIVMS ¹ (%) | Referencia |
|---|--|---|-----------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| Experimentos con arqueas metanogénicas | | | | | | |
| Evaluar el efecto de la Lv pura sobre crecimiento de metanógenos y microbiota de seres humanos. | | Técnica: tubos Hungate Medio de cultivo: SAB Inoculo: <i>M. smithii</i> | 4 | 100 | NR ³ | Demonfort et al. 2016 |
| Evaluar Lv pura sobre la producción de CH ₄ de cultivos puros de arqueas. | | Técnica: tubos Hungate Medio de cultivo: BRN Inoculo: cepas puras de <i>Methanobrevibacter</i> | 4 | 99 | NR | Miller y Wolin, 2001 |
| Evaluar Lv producida en FES sobre la metanogénesis de <i>M. smithii</i> . | | Técnica: botellas serológicas Medio de cultivo: Balch 1 (DSMZ, Germany) Inoculo: <i>M. smithii</i> | 50 | 100 | NR | Jahromi et al. 2013b |
| Experimentos con fluido ruminal y dietas experimentales | | | | | | |
| Evaluar metabolitos secundarios de hongos sobre la producción de CH ₄ | Animal: ovinos Dieta: Heno (2 veces al día) | Técnica: tubos Hungate Sustrato: heno de alfalfa Inoculo: fluido ruminal | 40 | 9.4 | 65 | Morgavi et al. 2014 |
| Evaluar Lv producida en FES sobre producción de CH ₄ ruminal | Animal: bovino Dieta: relación f.c ⁴ (40:60) | Técnica: jeringas de vidrio calibradas Sustrato: rastrojo de arroz Inoculo: fluido ruminal | 4.3 | 24 | NR | Jahromi et al. 2013 |
| Comparar diferentes aditivos para reducir la metanogénesis ruminal | Animal: bovino Dieta: relación f.c (60:40) | Técnica: botellas serológicas Sustrato: ryegrass, silo y cebada, f.c (50:50) Inoculo: fluido ruminal | 3.2 | NS ² | 49 | O Brien et al. 2014 |
| Evaluar varios componentes puros y aceite de ajo sobre la metanogénesis ruminal | Animal: bovino Dieta: heno ryegrass y concentrado | Técnica: sistema RUSITEC Sustrato: heno ryegrass, soya y cebada, f.c (50:50) Inoculo: fluido ruminal | 150 | 40 | NR | Soliva et al. 2011 |
| Evaluar algunos compuestos encontrados en el aceite de ajo sobre la fermentación ruminal | Animal: Bovino Dieta: relación f.c (50:50) | Técnica: Tubos polipropileno (batch) Sustrato: dieta con relación f.c (50:50) Inoculo: fluido ruminal | 5 | NS | 62.4 | Busquet et al. (2005) |

¹digestibilidad *in vitro* de la materia seca; ²No significativo; ³No reportado; ⁴relación forraje: concentrado; ⁵ácidos grasos volátiles

1.5.2. Experimentos *in vivo*

Los experimentos *in vivo* donde se evaluó la mitigación de metano ruminal asociada a la Lv utilizaron principalmente rastrojos fermentados como portadores de Lv. El Cuadro 2 resume la información de esas investigaciones.

Los trabajos con bovinos son escasos, solo se ha publicado un artículo en la literatura científica con bovinos productores de carne como modelo de estudio. Ramírez-Restrepo *et al.* (2014) evaluaron con cuatro niveles ascendientes de levadura roja de arroz como portador de Lv en la dieta, sobre el consumo de MS, ganancia de peso vivo (PV) y emisiones de CH₄ de ruminal. Los resultados de esta investigación reportan una disminución de CH₄ g/kg MS de 14.5 %, esto se obtuvo con una concentración de Lv 0.92 mg/kg PV.

Las investigaciones con pequeños rumiantes realizadas por Morgavi *et al.* (2013) estimaron el efecto de arroz fermentado como portador de Lv (dosis 2.26 mg/kg PV en ovinos) en una dieta basada en grano y heno de arroz (relación, 50:50). Los resultados sugieren una disminución de 30 % sobre la producción de metano ruminal. Resultados similares fueron reportados por Azlan *et al.* (2018) quienes evaluaron Lv producida en FES sobre la metanogénesis ruminal de caprinos, en este experimento sustituyeron rastrojo de arroz (40 %) por rastrojo de arroz fermentado en la dieta experimental para obtener una dosis de Lv 4.14 mg/ kg PV, con esto obtuvieron una disminución de CH₄ ruminal de 34 %. Otro experimento bajo condiciones similares Candyrine *et al.* (2018) reportaron que la Lv producida en FES (subproductos de la extracción de aceite de palma) mezclada en dietas para cabras, con dosis de Lv 4 y 6 mg kg/PV mitigó 11 y 20 % la producción de metano ruminal, respectivamente. Al respecto, Wang *et al.* (2016) evaluaron levadura roja de arroz, con una dosis de Lv 4.34 mg/Kg PV, en una dieta para caprinos alta en forraje (70 %) donde reportan una ligera disminución de CH₄ de 13 % (g/kg MS consumida).

Cuadro 2. Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal y digestibilidad de la materia seca en experimentos *in vivo*

| Fuente de Lovastatina | Animal y dieta experimental | Técnica para estimar CH ₄ <i>in vivo</i> | Lv (mg/kg PV ²) | Producción de metano (g CH ₄ /Kg MS consumida) | | DMS ¹ (%) | Referencia |
|---|--|---|-----------------------------|---|-------------|----------------------|--------------------------------|
| | | | | Control | Tratamiento | | |
| Proceso: FES Sustrato: Arroz Cepa: <i>Monascus spp.</i> | Animal: Ovinos Dieta: Restringida a base de arroz (50 %) y heno de arroz (50 %) | Hexafluoruro de azufre (SF6) | 2.26 | 35.2 | 24.9 | NR ⁴ | Morgavi <i>et al.</i> 2014 |
| Proceso: FES Sustrato: Rastrojos de arroz Cepa: <i>A. terreus</i> | Animal: Caprinos Dieta: relación f.c (60:40) ³ | Cámaras de respiración de circuito abierto | 4.14 | 60 | 35 | +13 | Azlan <i>et al.</i> 2018 |
| Proceso: FES Sustrato: Arroz Cepa: <i>M. purpureus</i> | Animal: Caprinos Dieta: relación f.c (70:30) | Cámaras de respiración de circuito abierto | 4.34 | 20 | 18.3 | NS ⁵ | Wang <i>et al.</i> 2016 |
| Lv comercial (98 % pureza, Yick-Vic Chemicals and Pharmaceuticals Ltd, Hong Kong, China) | Animal: ovinos Dieta: relación f.c (70:30) | Cámaras de respiración de circuito abierto | 1.06 | 25.1 | 25.9 | NS | Klevenhusen <i>et al.</i> 2011 |
| Lavadura roja de arroz (Zhejiang Medicines and Health Products, Hangzhou, China) | Animal: Bovino Dieta: relación f.c (85:15) | Cámaras de respiración de circuito abierto | 2.23 | 20 | 19.2 | NR | Ramírez <i>et al.</i> 2014 |
| Proceso: FES Sustrato: residuos de la extracción de aceite de palma Cepa: <i>A. terreus</i> | Animal: Caprinos Dieta: relación f.c (77:23) | Cámaras de respiración de circuito abierto | 6 | 24.23 | 19.23 | NS | Candyrine <i>et al.</i> 2018 |

¹digestibilidad de la materia seca; ²peso vivo; ³relación forraje: concentrado; ⁴No reportado; ⁵No significativo.

Sin embargo, Klevenhusen *et al.* (2011) demostraron que Lv pura con una dosis menor a las anteriores (0.94 mg/kg PV), en una dieta para ovinos alta en forraje (48.2 %) no tiene efectos significativos sobre la metanogénesis ruminal.

2. Justificación

Las emisiones de metano entérico ruminal representan un tercio del total de las emisiones antropogénicas de metano y son las más abundantes del sector agrícola-pecuario. Los bovinos productores de carne y de leche son los que mayor alcance tienen al respecto. Por lo tanto, sus sistemas de producción deben reorientarse, no solo a optimizar su productividad sino también a minimizar su impacto ambiental.

La Lv se considera una opción para mitigar la producción de CH₄ ruminal, sin embargo, existen dudas sobre los resultados a nivel *in vitro* principalmente cuando los sustratos (dietas para bovinos) e inóculo (fluido ruminal) son complejos. Además, comparar a la Lv con otros inhibidores de la metanogénesis bajo condiciones similares podría demostrar la viabilidad de este compuesto.

Finalmente, se ha recomendado ampliamente evaluar la factibilidad de cualquier compuesto inhibidor de la metanogénesis primero a nivel *in vitro*. Esto podría elucidar posibles impactos sobre la producción animal y medio ambiente, así como también ayudaría a plantear experimentos con animales.

3. Hipótesis general

La Lv tendrá un efecto inhibitorio sobre la producción de metano ruminal, aumentará la concentración de metabolitos de fermentación, disminuirá la abundancia relativa de arqueas y no afectará la abundancia de bacterias involucradas en la degradación de la fibra en experimentos *in vitro*.

3.1. Hipótesis particulares

- i. La Lv disminuirá la producción de metano ruminal de dietas para bovinos productores de carne y leche.
- ii. La Lv aumentará la concentración de metabolitos finales de fermentación ruminal de bovinos tales como AGV e H₂.
- iii. La Lv disminuirá la abundancia relativa de arqueas metanogénicas y no afectará la abundancia de bacterias que interviene en la degradación ruminal de una dieta para bovinos productores de carne.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de la Lv sobre la producción de metano ruminal, metabolitos de fermentación, abundancia relativa de arqueas metanogénicas y de bacterias involucradas en la degradación de la fibra en experimentos *in vitro*.

4.1. Objetivos particulares

- i. Evaluar el efecto de la Lv sobre producción de metano de bovinos productores de carne y de leche.
- ii. Evaluar el efecto de la Lv sobre la concentración de metabolitos finales de fermentación ruminal e.g. AGV e H₂.
- iii. Estudiar las comunidades microbianas ruminales para establecer el efecto de la Lv sobre la abundancia relativa de arquea y bacterias, así como profundizar la interpretación de estos resultados en conjunto con los de la fermentación ruminal.

5. Materiales y Métodos

5.1. Estrategia de trabajo

Este proyecto constó de tres años de actividades experimentales y un año de respaldo para escribir la tesis y artículos adicionales. La investigación se dividió en tres fases y siete actividades principales (Figura 5). La etapa 1 se enfocó en producir Lv mediante FES, estandarizar una metodología para la extracción y cuantificación de Lv, así como determinar la composición bromatológica de los rastrojos antes y después de la FES. Con base a lo anterior se seleccionó la cepa y sustrato con mejor rendimiento de Lv (CDBB H-194 y rastrojo de avena). Posteriormente, se evaluó el efecto anti metanogénico del rastrojo de avena fermentado como portador de Lv en una ración para bovinos productores de carne. También, se realizó un experimento *in vitro* para evaluar Lv pura en comparación con la MON y el BES sobre la inhibición de metano ruminal y concentración de AGV.

Durante la etapa 2 se secuenciaron las muestras de fluido ruminal (actividades 2 y 3) y se realizó su análisis bioinformático. Se analizó el efecto anti metanogénico de la Lv pura con una dieta e inóculo de bovinos productores de leche, así como también la remoción de Lv bajo estas condiciones. Finalmente, en la Etapa 3 enfocó principalmente al análisis bioinformático de las actividades 2 y 3 en conjunto de resultados con técnicas de estadística multivariada.

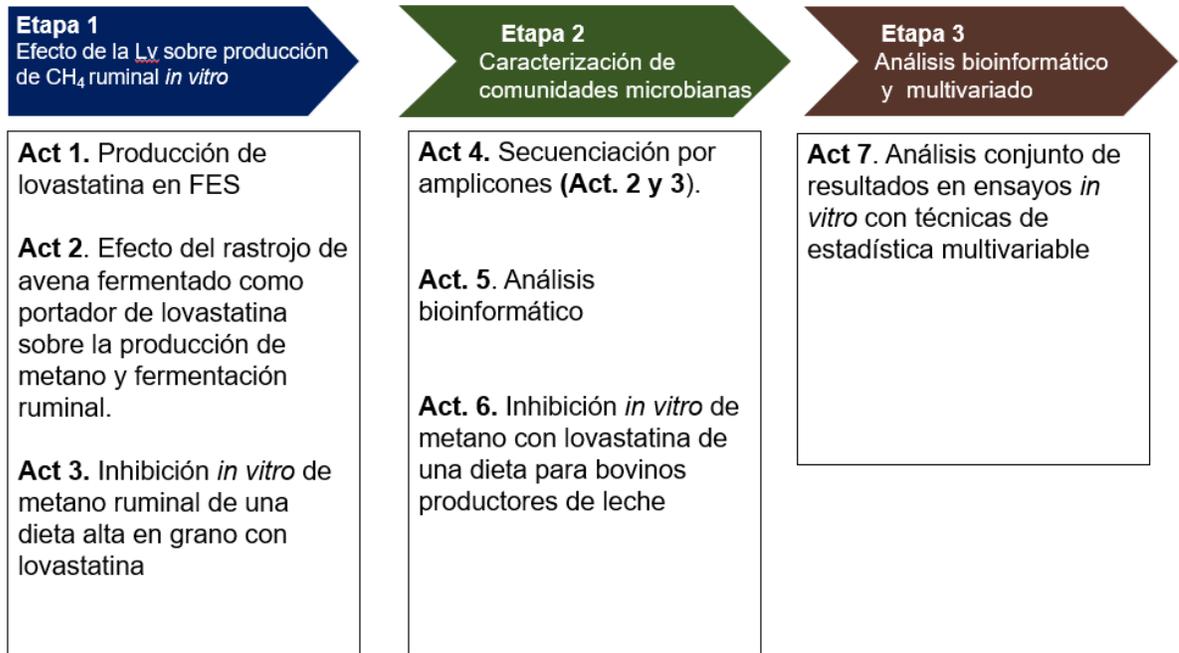


Figura 5. Etapas y actividades experimentales del presente proyecto doctoral.

5.2. Actividad 1. Producción de lovastatina en fermentación en estado sólido

5.2.1. Diseño experimental

Se realizó un experimento para producir Lv en FES mediante un diseño factorial 2^2 con medidas repetidas a lo largo del tiempo (0, 6, 12, y 16 d de incubación), donde el primer factor fue la cepa de *Aspergillus terreus* (CDBB H-194 y CDBB H-1976). El segundo factor correspondió al sustrato (rastroy de avena y salvado de trigo). Cada tratamiento se realizó por triplicado. La producción de Lv fue la principal variable de respuesta, mientras que el tipo de cepa, tipo de sustrato y tiempo de fermentación se consideraron como efectos fijos.

Con base al análisis anterior (mayor rendimiento de Lv) se seleccionó la cepa (CDBB H-194) para evaluar la eficiencia de degradación lignocelulósica con ambos sustratos de FES.

5.2.2. Mantenimiento de cultivo y suspensión de las esporas

Las cepas de *Aspergillus terreus* (CDBB H-194 y CDBB H-1976) se obtuvieron de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV. Se cultivaron en un medio PDA (potato agar dextrosa) en cajas Petri a 30°C por 6 días. Posteriormente se realizó la suspensión de las esporas; se adicionó 5 mL de solución estéril tween-80 (0.1 %), se agitó manualmente la caja Petri por 1 minuto. Las esporas fueron contadas en una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases, se ajustaron a una concentración aproximada de 10^7 esporas/mL, y se tomaron 2 mL de la suspensión de esporas como inóculo (Mouafi *et al.*, 2016).

5.2.3. Sustrato de fermentación en estado sólido

El rastrojo de avena y salvado de trigo se obtuvieron de la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México. El rastrojo de avena fue molido y se utilizó una criba de 0.4 cm de diámetro. Las muestras se conservaron en bolsas de plástico en refrigeración a 4°C.

5.2.4. Análisis bromatológico

Los sustratos fueron secados a 50°C/48 h. El análisis bromatológico se realizó de acuerdo a los métodos de la AOAC (2002); materia seca 934.01 (MS), extracto etéreo 920.29 (EE); cenizas 942.05, y proteína cruda 976.05 (CP). Las variables fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), hemicelulosa (FDN – FDA), celulosa (FDA – lignina) y lignina se terminaron de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991).

5.2.5. Preparación y condiciones de fermentación en estado sólido

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL, se les agregó 5 g de sustrato en base a peso seco, el contenido de humedad fue ajustado a 70 % con la siguiente solución mineral (g/L); KH_2PO_4 2.1, MgSO_4 0.3, CaCl_2 0.3, FeSO_4 0.11, ZnSO_4 , NaNO_3 0.5, metionina 1.5 y glicerol: 20 mL/L (Jirasatid *et al.*, 2013), el pH se ajustó a 6. Después, los matraces cargados con los sustratos y el medio fueron esterilizados a 121°C por 15 min y se inocularon con 2 mL de la suspensión de spora. Los matraces fueron incubados a 30°C las primeras 48 horas, seguido a 28°C por un día, después a 26°C por el resto de la incubación (Xu *et al.*, 2005). El contenido de los matraces fue agitado manualmente dos veces al día.

5.2.6. Extracción y cuantificación de lovastatina

Cada muestra fue secada a 60 °C por 24 h y molida en un mortero. Se pesó 1 g de sustrato molido, se depositó en un matraz de 200 mL, se le agregaron 40 mL de acetato de etilo, y se mantuvieron en agitación por 2 horas a 200 rpm. El acetato de etilo se evaporó en un rotavapor, los extractos fueron re suspendidos en 5 mL de acetonitrilo:H₂O (80:20 v/v) y se filtraron con un acrodisco de acetato (Millipore, MA, USA) poro 0.45 µm (Jaivel y Marimuthu, 2010).

Posteriormente, se cuantificó la Lv mediante un equipo de HPLC-UV (Varian Analytical Instruments, Model 9010, CA, USA) de acuerdo con la metodología de Yang y Hwang (2006). Se utilizó una columna Gemini 5U C18 (Phenomenex, CA, USA) y como fase móvil acetonitrilo: H₂O (70:30 v/v) acidificada con H₃PO₄ al 0.1 % (flujo de 0.5 mL/min). La longitud de onda fue 235 nm. El volumen de inyección fue de 50 µL. El estándar de Lv se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) (Lorenz y Parks 1990; Patil *et al.* 2015).

5.2.7. Eficiencia de degradación lignocelulósica

Las eficiencias de degradación de lignina y de ‘celulosa + hemicelulosa’ en el rastrojo de avena y salvado de trigo con la cepa *A. terreus* (CDBB H-194) se estimaron de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3, respectivamente.

$$\eta_{lig} = 1 - (\gamma_{ligf} / \gamma_{ligi}) * [(1 - \gamma_{ligi}) / (1 - \gamma_{ligf})] \quad (2)$$

$$\eta_{(c+h)} = 1 - (\gamma_{(c+h)f} / \gamma_{(c+h)i}) * [(1 - \gamma_{(c+h)i}) / (1 - \gamma_{(c+h)f})] \quad (3)$$

Donde γ_{ligi} y $\gamma_{(c+h)i}$ son los contenidos iniciales de lignina y ‘celulosa + hemicelulosa’ en los sustratos, respectivamente. γ_{ligf} y $\gamma_{(c+h)f}$ son los contenidos finales de lignina y ‘celulosa + hemicelulosa’ en los sustratos, respectivamente. Las γ se expresan en kg/kg de MS. Las ecuaciones 2 y 3 se expresan en decimales, estas pueden ser multiplicadas por 100 para reportar la eficiencia de degradación en porcentaje.

El índice ε , el cual sugiere si la degradación de ‘celulosa + hemicelulosa’ es mayor que la de lignina se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación (Ec. 4):

$$\varepsilon = \eta_{lig} / \eta_{(c+h)} \quad (4)$$

Donde η_{lig} y $\eta_{(c+h)}$ son las eficiencias de degradación de lignina y ‘celulosa + hemicelulosa’ del rastrojo de avena y salvado de trigo.

La eficiencia de FES (E_{SSF}) se calculó con la ecuación 5 (Shrivastava *et al.*, 2014):

$$E_{SSF}(\%) = [(pérdida de lignina) / (pérdidas de hemicelulosa + celulosa)] * 100 \quad (5)$$

5.2.8. Análisis estadístico

Los datos de producción de Lv se analizaron mediante un diseño factorial 2² con medidas repetidas en tiempo, se utilizó el procedimiento MIXED de SAS studio, (SAS Institute Inc., 2018). El tratamiento y los tiempos se consideraron como efecto fijo y la unidad experimental y repetición como efectos aleatorios. La estructura de covarianza se seleccionó en base a los criterios de información de Akaike y de los criterios bayesianos de Schwarz (Littell *et al.*, 2006). Por otra parte, los coeficientes de cinética de orden cero de los rendimientos finales

de Lv en cada tratamiento fueron analizadas con un modelo factorial 2². La comparación de medias múltiples se realizó con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

5.3. Actividad 2. Efecto del rastrojo de avena como portador de lovastatina sobre la producción de metano ruminal

5.3.1. Diseño experimental

Se realizó una prueba en lote, el sustrato de fermentación ruminal fue una dieta alta en grano, la cual contenía rastrojo de avena, este último se reemplazó por RAF en tres proporciones 9.5, 18.9, y 28.4 %, con esto se obtuvieron las siguientes dosis de Lv en el medio de fermentación ruminal; 50, 100, y 150 mg/L. Se usó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y un control. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las variables principales de respuesta fueron la producción de gas total (PGT), metano, hidrógeno, y AGV.

5.3.2. Análisis bromatológico de las dietas experimentales

Las dietas fueron secados a 50 °C/48 h y almacenados a 4 °C. El análisis bromatológico se realizó de acuerdo a los métodos de la AOAC (2002): MS, 934.0; EE, 920.29; cenizas 942.05, y PC, 976.05. Las variables FDN y FDA se terminaron de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991).

5.3.3. Técnica producción de gas *in vitro*

Se usaron frascos serológicos de 120 mL como digestores, se les adicionó 0.5 g de una dieta para bovinos molidos mezclada con el RAF, a un tamaño de partícula de 1 mm (Cuadro 3). Después, se le añadieron 30 mL del medio de cultivo anaerobio (Menke y Steingass, 1988; Anexo 9.1), se ajustó el pH a 6.8 y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 103 kPa gauge. Las botellas fueron purgadas con CO₂ y conservadas a -4 °C.

El inóculo de fluido ruminal se obtuvo de tres novillos fistulados y canulados del rumen. Los novillos fueron alimentados con una dieta que contenía 40 % de concentrado y 60 % de forraje. El fluido ruminal se extrajo 2 h después de alimentar a los animales y se transportó en termos (2 L) precalentados con agua destilada a 39 °C.

Cuadro 3. Ingredientes, proporción de rastrojo de avena fermentado y composición química de las dietas experimentales

| Ingrediente MS, g/Kg | Concentración de Lv (mg/L) | | | |
|------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 |
| Maíz molido | 566 | 566 | 566 | 566 |
| Soya | 120 | 120 | 120 | 120 |
| Urea | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Mezcla mineral + vitaminas | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Rastrojo de avena | 284 | 189 | 95 | 0 |
| Rastrojo de avena fermentado | 0 | 95 | 189 | 284 |
| Composición química, % MS | | | | |
| Materia Orgánica | 90.37 | 90.03 | 90.10 | 89.38 |
| Proteína Cruda | 12.01 | 12.62 | 12.35 | 13.70 |
| Cenizas | 5.25 | 5.53 | 5.73 | 6.01 |
| FDN ^a | 58.08 | 60.18 | 65.34 | 59.69 |
| FDA ^b | 13.48 | 13.38 | 13.12 | 13.04 |

FDN^a: Fibra detergente neutro; FDA^b: Fibra detergente ácido.

Se inocularon 15 mL del fluido ruminal filtrado con cuatro capas de tela manta de cielo en las botellas serológicas previamente cargadas con la dieta, medio de cultivo y RAF. Finalmente, se incubaron a 39 °C y 90 rpm por 48 h.

5.3.4. Cuantificación de gas total, metano e hidrógeno

La PGT, CH₄ e hidrógeno fueron cuantificadas a las 12, 24, 36 y 48 h de incubación. Para

estimar la PGT cada botella serológica fue conectada con manguera tygon a un medidor de gas “salmuera” (Muñoz-Páez *et al.*, 2014). Se usó un blanco (medio mineral + fluido ruminal) para ajustar el rendimiento de gas en cada tratamiento.

La producción de metano e hidrógeno se cuantificó antes de medir la PGT, se muestreó (1 mL) del espacio gaseoso de cada digester con una jeringa para muestras gaseosas y se inyectó en un cromatógrafo (Gow-Mac, Model 350, Pittsburgh, PA, USA) equipado con un detector de conductividad térmica. Se utilizó una columna empacada de sílice gel 60/80 de diámetro. La temperatura del inyector, detector, y columna fueron 37, 100 y 70 °C respectivamente, se usó argón como gas acarreador. Los estándares de Ar, H₂, y CH₄ fueron grado cromatográfico (> 99.9 %, INFRA S.A. de C.V., Ciudad de México, México).

El volumen de gas se calculó de acuerdo con la ley de los gases ideales (Castellan, 1987) a partir de los datos de presión y temperatura de las muestras. Los volúmenes de gas total y metano se normalizaron (SmL) a presión y temperatura de 101,32 kPa y 298 K, respectivamente (Ábrego-García *et al.*, 2021).

5.3.5. Determinación de ácidos grasos volátiles

Las muestras se prepararon de acuerdo a Cottyn y Boucque (1968). Brevemente, en un tubo Eppendorf (1.5 mL) se depositaron 250 µL de ácido metafosfórico (25 % p/v) y 750 µL del fluido ruminal de las botellas serológicas. Después, los tubos fueron centrifugados a 6000 xg por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante en viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer, USA). Para determinar los AGV se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Auto System, USA) equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar (ZB-WAX, Phenomenex, USA). La temperatura del detector fue de 250 °C

y la del inyector de 230 °C. Se utilizó N₂ como gas acarreador a un flujo de 9 Psi. El desarrollo del programa de temperatura fue desarrollado de acuerdo con las necesidades requeridas para su determinación en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav-IPN (Cuadro 4).

Cuadro 4. Programa de temperatura (GC) para determinar ácidos grasos volátiles

| | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Incremento (°C/min) |
|---|------------------|--------------|---------------------|
| 1 | 70 | 3 | 15 |
| 2 | 155 | 8 | 30 |
| 3 | 200 | 8 | 10 |
| 3 | 250 | 0 | fin |

Las concentraciones de AGV, se compararon las áreas de los cromatogramas (Anexo Fig. A1) de las muestras contra la curva de los estándares de calibración del ácido acético, propiónico, butírico, y valerico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

5.3.6. Análisis estadístico

Las variables PGT, metano, hidrógeno y AGV (acetato, propionato, butirato, valerato y la relación acetato/propionato) se analizaron mediante ANOVA con el procedimiento GLM de SAS studio (SAS Institute Inc., 2018) y se realizó la prueba de medias múltiples de LSD (Least significant difference).

5.4. Actividad 3. Inhibición *in vitro* de la metanogénesis ruminal de una dieta alta en grano con lovastatina

5.4.1. Diseño experimental

Se realizó una prueba de fermentación ruminal *in vitro* en lote, se utilizó una dieta alta en grano, fluido ruminal de bovinos, Lv pura, y otros dos compuestos anti metanogénicos (MON y BES). Se empleó un diseño completamente al azar con tres tratamientos: Lv, MON, BES y un control (CON). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las variables de respuesta; la PGT y CH₄ se muestrearon a las 12, 24, 36 y 48 h. La producción y proporciones de AGV se muestrearon a las 48 h.

5.4.2. Hidrólisis y determinación de la lovastatina en forma β- hidroxilado

La Lv (pureza 97.0 %+) se adquirió en forma LA inactiva. Se hidrolizó a su forma HI activa con una solución de NaOH-EtOH [(15 % (v/v) etanol, 0.25 % (p/v) NaOH)] después, se incubó a 55 °C/1 h, se ajustó el pH a 7.2 con HCL 0.1 N (Lorenz y Parks 1990) y se filtró con acrodiscos de 0.45 μm (Millipore, MA, USA).

Posteriormente, se determinó la concentración de Lv en forma HI por HPLC-UV (Varian Analytical Instruments, Model 9010, CA, USA) de acuerdo con Yang y Hwang (2006). Se utilizó una columna Gemini 5U C18 (Phenomenex, CA, USA) y como fase móvil acetonitrilo: H₂O (70:30 v/v) acidificada con H₃PO₄ al 0.1 % (flujo de 0.5 mL/min). La longitud de onda fue 235 nm. El volumen de inyección fue de 50 μL. El estándar de Lv se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) (Lorenz y Parks 1990; Patil *et al.*, 2015).

5.4.3. Técnica de producción de gas *in vitro*

Se usaron frascos serológicos de 120 mL como digestores, se les adicionó 0.5 g de una dieta para bovinos (tamaño de partícula 1 mm), la cual contenía (%): maíz molido, 56.6; soya 12; urea, 1; mezcla mineral, 2 y rastrojo de avena, 28.4. Después, se le añadieron 30 mL del medio de cultivo anaerobio (Menke y Steingass 1988; Anexo 9.1) se ajustó el pH del medio a 6.8 y fueron estelarizados en autoclave a 121°C y 103 kPa gauge. Posteriormente, se agregaron los siguientes tratamientos: Lv 300 mg/L (Fermic, SA de CV, Ciudad de México, México). El BES y la MON se dosificaron a 20 y 6 mg/L respectivamente; ambos compuestos (pureza 99.0 %+) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA) y se diluyeron en agua destilada-estéril. Todos los tratamientos se aplicaron en un volumen de 1 % (v/v) del medio de cultivo. Finalmente, las botellas fueron purgadas con CO₂ y conservadas a -4 °C.

El inóculo de fluido ruminal se obtuvo de tres novillos fistulados y canulados del rumen. Los novillos fueron alimentados con una dieta que contenían 40 % de concentrado y 60 % de forraje. El fluido ruminal se extrajo 2 h después de alimentarse, se transportó en termos (2 L) precalentados a 39 °C, y fue llevado al laboratorio en un tiempo menor a 1 h.

Se inocularon 15 mL del fluido ruminal filtrado con cuatro capas de tela manta de cielo en las botellas serológicas previamente cargadas con la dieta, medio de cultivo, e inhibidor metanogénico y se incubaron a 39 °C y 90 rpm por 48 h. Se usó un blanco por triplicado para ajustar la PGT, el cual contenía 30 mL de la solución mineral + 15 mL del fluido ruminal.

5.4.4. Cuantificación de gas total y metano

La PGT y de CH₄ fueron cuantificadas a las 12, 24, 36 y 48 h de incubación. Para estimar la PGT cada botella serológica fue conectada con manguera tygon a un medidor de gas por desplazamiento de salmuera (Muñoz-Páez *et al.*, 2014). La PGT del blanco fue usada para calcular el rendimiento de gas en cada tratamiento.

El metano se cuantificó antes de medir la PGT, se muestreó (1 mL) del espacio gaseoso de cada digester con una jeringa de muestras gaseosas y se inyectó en un cromatógrafo (Gow-Mac, Model 350, Pittsburgh, PA, USA) equipado con un detector de conductividad térmica. Se utilizó una columna empacada de sílice gel 60/80 de diámetro. La temperatura del inyector, detector, y columna fueron 37, 100 y 70 °C respectivamente. El gas acarreador argón y el estándar CH₄ fueron grado cromatográfico (> 99.9 %, INFRA S.A. de C.V., Ciudad de México, México).

El volumen de gas se calculó con la ley de los gases ideales (Castellan, 1987) a partir de los datos de presión y temperatura de las muestras. Los volúmenes de gas total y metano se normalizaron (SmL) a presión y temperatura de 101,32 kPa y 298 K, respectivamente (Ábrego-García *et al.*, 2021).

5.4.5. Determinación de ácidos grasos volátiles

Las muestras se prepararon de acuerdo a la metodología de Cottyn y Boucque (1968). Brevemente, en un tubo Eppendorf (1.5 mL) se depositaron 250 µL de ácido metafosfórico (25 % p/v) y 750 µL del fluido ruminal de las botellas serológicas. Después, los tubos fueron centrifugados a 6000 xg por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante en viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer, USA). Para determinar los AGV se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Auto System, USA) equipado con detector de

ionización de flama (FID) y una columna capilar (ZB-WAX, Phenomenex, USA). La temperatura del detector fue de 250 °C y la del inyector de 230 °C. Se utilizó N₂ como gas acarreador a un flujo de 9Psi. El desarrollo del programa de temperatura fue desarrollado de acuerdo con las necesidades requeridas para su determinación en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav-IPN (Cuadro 4).

5.4.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS studio (SAS Inst. 2018). La comparación de medias se realizó con la prueba mínima diferencia significativa (Steel *et al.* 1997). Se usó el siguiente modelo matemático (Ec. 6):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad (6)$$

Donde: Y_{ij} = Variable respuesta en la j -ésima repetición (botella serológica) del i -ésimo tratamiento; μ = Media general de todos los datos del experimento; T_i = Efecto del tratamiento i ; ε_{ij} = Error experimental asociado al j sujeto bajo el i tratamiento.

5.5. Actividad 4. Caracterización de comunidades microbianas del rumen

5.5.1. Diseño experimental

Se usó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones; control, RAF (Lv 150 mg/L) e inóculo (fluido ruminal), las muestras de ADN se obtuvieron de la actividad 2. Se analizaron los índices de alfa y beta diversidad, así como la abundancia relativa. Finalmente, se realizó la correlación de Spermán entre la microbiota y los metabolitos finales de fermentación ruminal.

5.5.2. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de muestras (actividad 2) de 6 mL de la parte superficial y 6 mL del fondo de las botellas serológicas siguiendo las instrucciones del kit UltraClean Soil DNA Isolation de MO BIO (Anexo 9.2). Se empleó un volumen de re-suspensión de 60 μ L, la cuantificación se realizó en un equipo Epoch™ Microplate Spectrophotometer (Anexo Cuadro A1). La integridad de las muestras extraídas se comprobó con una electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 70 Volts durante 20 minutos (Anexo Fig. A2).

5.5.3. Secuenciación por amplicones

Las librerías se realizaron siguiendo las instrucciones del kit Nextera XT DNA Library Preparation de Illumina. Como primer paso las muestras fueron diluidas a una concentración de 5 ng/ μ L.

Se utilizaron primers específicos para la región V4 de arqueas y bacterias (Zhu *et al.*, 2018) a los cuales se les adicionó la secuencia de anclaje de la plataforma Illumina MiSeq.

La secuencia de primers para la región V4 del rDNA 16s fueron:

515F 5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'

806R 5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'

Las reacciones de PCR se realizaron con la polimerasa SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) a un volumen final de 25 µL, las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 segundos, 25 ciclos de desnaturalización a 98 °C/10 segundos, una temperatura de alineamiento de 50 °C/ 30 segundos, una extensión a 72 °C/ 30 segundos, y un último paso a 72 °C/ 5 minutos. El tamaño e integridad de los amplicones se verificó por medio de gel de agarosa 1 % a 100 volts.

Una vez cuantificadas las muestras tanto del fondo y de la superficie de las botellas, éstas fueron mezcladas añadiendo el equivalente a 50 ng de DNA de cada muestra en un microtubo de 0.5 mL, se secaron en un concentrador Eppendorf, se re suspendieron en 10 µL de agua y se cuantificó nuevamente la concentración de DNA en un espectrofotómetro NanoDrop. Posteriormente, se realizó una primera purificación del producto con perlas magnéticas AMPure XP (Anexo 9.3).

Se realizo una segunda PCR para añadir los índices Illumina específicos a cada muestra (Cuadro 5), las condiciones fueron: 98 °C por 3 minutos (1 ciclo), 98 °C por 30 segundos/55 °C por 30 segundos/72 °C por 30 segundos (8 ciclos) y un paso de extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Cuadro 5. Índices Illumina correspondientes para cada muestra

| Muestra | | | Índices | |
|-------------|------|----------|---------|----------|
| Inóculo-r1 | S502 | CTCTCTAT | N701 | TAAGGCGA |
| Inóculo-r2 | S502 | CTCTCTAT | N702 | CGTACTAG |
| Inóculo-r3 | S502 | CTCTCTAT | N703 | AGGCAGAA |
| Con Lv p-r1 | S502 | CTCTCTAT | N704 | TCCTGAGC |
| Con Lv p-r2 | S515 | TTCTAGCT | N701 | TAAGGCGA |
| Con Lv p-r3 | S508 | CTAAGCCT | N707 | CTCTCTAC |
| Lv 300-r1 | S515 | TTCTAGCT | N704 | TCCTGAGC |
| Lv 300-r2 | S510 | CGTCTAAT | N707 | CTCTCTAC |
| Lv 300-r3 | S511 | TCTCTCCG | N706 | TAGGCATG |
| Con RAF-r1 | S503 | TATCCTCT | N704 | TCCTGAGC |
| Con RA-r2 | S521 | GAGCCTTA | N701 | TAAGGCGA |
| Con RAF-r3 | S521 | GAGCCTTA | N702 | CGTACTAG |
| RAF 150-r1 | S521 | GAGCCTTA | N703 | AGGCAGAA |
| RAF 150-r2 | S521 | GAGCCTTA | N704 | TCCTGAGC |
| RAF 150-r3 | S522 | TTATGCGA | N701 | TAAGGCGA |

Inóculo-r, inóculo fluido ruminal; Con Lv p-r, control del experimento de con Lv comercial; Lv 300-r, tratamiento del experimento con Lv pura (300 mg/L); Con RAF-r, control del experimento con RAF como portador de Lv; RAF 150-r, tratamiento del experimento con RAF como portador de Lv (150 mg/L).

Posteriormente, se purificó el producto de la segunda PCR con perlas magnéticas AMPure XP (Anexo 9.3), el producto (DNA) purificado fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop, una vez verificada la pureza se realizó una segunda cuantificación utilizando un método fluorométrico Qubit.

Se determinó la longitud total del amplicón de 427 pb (producto de PCR = 291 pb + 147 pb de adaptadores de Illumina e índices) y el cálculo de la concentración nM se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula (Ec. 7):

$$\text{Concentración nM} = \frac{\text{Concentración ng/}\mu\text{L}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * \text{Tamaño de la biblioteca (pb)}} * 10^6 \quad (7)$$

Se realizó una mezcla equimolar de las muestras utilizando la fórmula (Ec. 8):

$$\text{Vol. Índice} = \frac{V(f) * C(f)}{\# \text{ muestra} * C(i)} \quad (8)$$

Donde: V(f) = Volumen final de la mezcla; C(f) = Concentración final de la mezcla (nM);
muestra = Número total de muestras presentes en la mezcla; C(i) = Concentración inicial de la biblioteca (nM)

5.5.4. Desnaturalización de bibliotecas y carga de muestra en la plataforma MiSeq

Para preparar el clúster y secuenciar el pool de bibliotecas, las muestras fueron desnaturalizadas: las bibliotecas de 4 nM se diluyeron a 20 pM, utilizando 5 μL de la librería de 4 nM con 5 μL de NaOH 0.2 N, incubando 5 minutos a temperatura ambiente y se le agregó 990 μL de buffer hibridación. Cada muestra incluyó una concentración de 5 % Phix, la cual sirve como control interno para las bibliotecas con baja diversidad. Los amplicones del 16S rRNA se secuenciaron por medio de la plataforma Illumina Miseq 2x250 paired-end, en la Unidad de Secuenciación y Polimorfismos del INMEGEN.

5.6. Actividad 5. Análisis bioinformático

Control de calidad y filtrado de secuencias se realizó con el paquete de software QIIME 2 (v. 2019.1), la secuencia correspondiente a los adaptadores fue eliminada utilizando la herramienta Cutadapt (Martin, 2011), las secuencias apareadas se unieron mediante q2-vsearch (Rognes *et al.*, 2016), el control de calidad se realizó utilizando el algoritmo de Deblur (Weiss *et al.*, 2017).

5.6.1. Clasificación Taxonómica de las secuencias del gen rRNA16S

El análisis taxonómico se realizó alineando las secuencias con un clasificador bayesiano enfocado a la región V4 del gen de rRNA 16S. Las secuencias se agruparon con un 99 % de similitud en unidad taxonómica operativas (OTUs). Cada lectura fue clasificada a nivel de filo, clase, orden, familia y genero con referencia a la base de datos Greengenes v. 13.8 (<http://greengenes.lbl.gov>). La abundancia relativa fue calculada dividiendo el número de secuencias de cada nivel taxonómico entre el total de número de secuencias por muestra.

5.6.2. Índices de alfa y beta diversidad

Los cálculos de diversidad alfa (OTU, Simpson, Shannon, Pielou y Chao) y beta (análisis de coordenadas principales) fueron realizados con la herramienta Diversity QIIME 2 (Rideout *et al.*, 2018).

5.6.3. Análisis estadístico

Los índices de alfa y beta diversidad, así como la abundancia relativa de arqueas y bacterias se analizaron mediante ANOVA con el procedimiento GLM de SAS studio (SAS Institute Inc., 2018) y se realizó la prueba de medias múltiples de LSD (Least significant difference).

Los gráficos de alfa y beta diversidad se crearon con el paquete ggplot de acuerdo con Hill *et al.* (2003). El análisis de componentes principales (PCA) se realizó con los paquetes Vegan y ggplot2 de R studio (3.6.1), respectivamente (Lê *et al.*, 2018). La correlación de Spearman entre los productos finales de fermentación y la microbiota ruminal se calculó de acuerdo al paquete Hmisc, R studio. Se consideró significancia estadística cuando el valor de $P < 0.05$.

5.7. Actividad 6. Inhibición *in vitro* de metano en bovinos productores de leche

5.7.1. Diseño experimental

Se realizó una prueba en lote donde se evaluaron dos sustratos de fermentación ruminal (una dieta para bovinos productores de leche y celulosa), inóculo (fluido ruminal de bovinos productores de leche) y una dosis única de Lv (300 mg/L). Las variables principales de respuesta para ambos experimentos fueron; PGT, producción de CH₄, AGV (acético, propiónico y butírico) y la remoción de la Lv en medio de cultivo ruminal.

5.7.2. Técnica de producción de gas *in vitro*

El inóculo de microorganismos ruminales se obtuvo de una vaca lechera fistulada y canulada del rumen. La vaca fue alimentada con una dieta que contenían 30 % de concentrado y 70 % de forraje. El fluido ruminal se extrajo 2 h después de alimentarse, se guardó en un termo (2 L) precalentado a 39 °C y fue llevado al Laboratorio 33 (DBB-CINVESTAV) en un tiempo aproximado de una hora.

Se usaron frascos serológicos de 120 mL como digestores, se le adicionó 0.5 g de sustrato: (i) dieta de bovinos lecheros que contenía (%): alfalfa 25; maíz molido 38; soya 11; rastrojo de avena 25; mezcla mineral 1 (tamaño de partícula 1 mm) y (ii) celulosa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Después, se le añadió un medio de cultivo que contenía: 30 mL de medio de cultivo anaerobio, (Menke, 1988; Anexo 9.1), se le agregó la Lv 300 mg/L (Fermic S.A de C.V) por último, se inocularon 15 mL del fluido ruminal previamente filtrado con cuatro capas de tela manta de cielo. Se usaron blancos por duplicado los cuales consistieron en el medio de cultivo y el fluido ruminal. Los viales fueron incubados a 39 °C y 90 rpm. Al término de incubación los digestores se colocaron en una vasija con hielo (-6 °C) por 10 min.

5.7.3. Cuantificación de gas total y metano

La PGT y CH₄ fueron cuantificados a las 12, 24, 36 y 48 h de incubación. Para estimar la PGT cada botella serológica fue conectada con manguera tygon a un medidor de gas por desplazamiento de salmuera (Muñoz-Páez *et al.*, 2014). La PGT del blanco fue usada para calcular el rendimiento de gas en cada tratamiento.

La producción de metano se cuantificó antes de medir la PGT se muestreó (1 mL) del espacio gaseoso de cada digestor con una jeringa de muestras gaseosas y se inyectó en un cromatógrafo (Gow-Mac, Model 350, Pittsburgh, PA, USA) con detector de conductividad térmica. Se utilizó una columna empacada de sílice gel 60/80 de diámetro. La temperatura del inyector, columna y detector fueron 25, 25 y 100°C respectivamente. El gas acarreador argón y el estándar CH₄ fueron grado cromatográfico (> 99.9 %, INFRA S.A. de C.V., Ciudad de México, México).

Los volúmenes de gases se calcularon con la ley de los gases ideales (Castellan, 1987) a partir de los datos de presión y temperatura de las muestras. Los volúmenes de gas total y metano se normalizaron (SmL) a presión y temperatura de 101,32 kPa y 298 K, respectivamente (Ábrego-García *et al.* 2021).

5.7.4. Determinación de ácidos grasos volátiles

Las muestras se prepararon de acuerdo a Cottyn y Boucque (1968). Se usaron tubos Eppendorf (1.5 mL), se depositaron 250 µL de ácido metafosfórico (25 % p/v) y 750 µL del fluido ruminal de las botellas serológicas. Después, los tubos fueron centrifugados a 6000 xg por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante en viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer, USA). Para determinar los AGV se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Auto System, USA) equipado con detector de ionización de flama (FID) y una

columna capilar (ZB-WAX, Phenomenex, USA). La temperatura del detector fue de 250 °C y la del inyector de 230 °C. Se utilizó N₂ como gas acarreador a un flujo de 9 Psi. El desarrollo del programa de temperatura fue desarrollado de acuerdo con las necesidades requeridas para su determinación en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav-IPN (Cuadro 4).

5.7.5. Remoción de la lovastatina

La extracción de Lv del medio de fermentación ruminal se realizó a los tiempos de incubación 0, 24, 48 y 72 h. Las botellas serológicas con medio de cultivo, sustrato, inóculo, y Lv se mantuvieron en vortex por 3 min, inmediatamente se extrajo 1 mL de muestra, se depositó en tubos con rosca de 5 mL y se le agregó 2 mL de acetonitrilo. La mezcla anterior fue sonicada por 10 min y centrifugada a 3500 xg durante 5 min (Demonfort *et al.*, 2017). Por último, se recuperó el sobrenadante y se filtró con un acrodisco, membrana de nylon, 0.45 µm (Millipore, MA, USA).

5.7.6. Determinación de lovastatina

Se determinó la concentración de Lv por HPLC-UV (Varian Analytical Instruments, Model 9010, CA, USA) de acuerdo con la metodología de Yang y Hwang (2006). Se utilizó una columna Gemini 5U C18 (Phenomenex, CA, USA) y como fase móvil acetonitrilo: H₂O (70:30 v/v) acidificada con H₃PO₄ al 0.1 % (flujo de 0.5 mL/min). La longitud de onda fue 235 nm. El volumen de inyección fue de 50 µL. El estándar se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) (Lorenz y Parks 1990; Patil *et al.*, 2015).

5.7.7. Análisis estadístico

Se realizaron dos pruebas de t–Student, la primera tuvo como control la dieta para bovinos productores de leche y como tratamiento, la dieta + Lv (300 mg/L). La segunda prueba utilizó como control la celulosa y el tratamiento consistió en celulosa + Lv (300 mg/L). Los análisis se realizaron con el procedimiento PROC TTES de SAS studio (SAS Institute Inc., 2018).

6. Resultados y discusión

6.1. Actividad 1. Producción de lovastatina en fermentación en estado sólido

6.1.1. Análisis bromatológico de los sustratos

El Cuadro 6 muestra el análisis bromatológico y de contenido de las fracciones de pared celular de los sustratos de FES, donde resalta el contenido de proteína cruda en el salvado de trigo, el cual fue cuatro veces mayor que en el rastrojo de avena (151.8 vs 43.3 g/kg MS). El contenido lignocelulósico del rastrojo de avena fue mayor que en el salvado de trigo de acuerdo con los valores de FDN y FDA. Una de las ventajas de este rastrojo como sustrato es su bajo costo, además este no es un alimento destinado para seres humanos, caso contrario del salvado de trigo.

Cuadro 6. Análisis bromatológico de los sustratos de fermentación en estado sólido

| Variable | Rastrojo de avena | Salvado de trigo |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| Materia seca (g/kg) | 945.2 ± 25.1 | 932.6 ± 18.7 |
| Composición química (g/kg MS) | | |
| Proteína cruda | 43.3 ± 6.1 | 151.8 ± 12.0 |
| Extracto etéreo | 31.1 ± 4.8 | 47.5 ± 5.2 |
| Cenizas | 62.6 ± 5.5 | 77.5 ± 6.7 |
| FDN ^a | 680.2 ± 52.6 | 568.0 ± 47.3 |
| FDA ^b | 415.8 ± 27.3 | 174.2 ± 15.8 |

^aFibra detergente neutro, ^bfibra detergente ácido.

6.1.2. Eficiencia de degradación lignocelulósica

El análisis de degradación lignocelulósica se realizó únicamente en la cepa CDBB H-194 con los dos sustratos de fermentación, esto se debió a su alta producción de Lv. Los resultados indicaron que la degradación de 'celulosa + hemicelulosa' tanto del rastrojo de

avena (24 %) y del salvado de trigo (30.2 %) fue mayor que la eficiencia de degradación de la lignina, la cual fue aproximadamente de 15 % para ambos sustratos (Cuadro 7). La relación de $\eta_{lig} / \eta_{(c+h)}$ para el rastrojo de avena ($\varepsilon = 0.6191$) y para el salvado de trigo ($\varepsilon = 0.5268$) confirmó que durante la FES ambos sustratos consumieron más ‘celulosa + hemicelulosa’ que lignina.

Cuadro 7. Composición de pared celular y eficiencias de degradación de ‘celulosa + hemicelulosa’ y lignina de *A. terreus* CDBB H-194

| Variable | Rastrojo de avena | | Salvado de trigo | |
|---------------------------------|-------------------|--------------|------------------|--------------|
| | No fermentado | Fermentado | No fermentado | Fermentado |
| Hemicelulosa (g kg/MS) | 267.5 ± 12.6 | 232.1 ± 15.5 | 393.9 ± 18.3 | 340.2 ± 16.0 |
| Celulosa (g kg/MS) | 324.2 ± 11.2 | 291.7 ± 12.0 | 118.0 ± 8.3 | 82.2 ± 7.4 |
| Lignina (g kg/MS) | 83.8 ± 10.2 | 74.2 ± 5.18 | 56.0 ± 3.0 | 47.6 ± 4.2 |
| $\eta_{(c+h)}$ ^a (%) | – | 24.10 | – | 30.24 |
| η_{lig} ^b (%) | – | 14.92 | – | 15.93 |
| ε (-) ^c | – | 0.6191 | – | 0.5268 |
| E_{FES} (%) ^d | – | 14.14 | – | 9.38 |

^aEficiencia de degradación de celulosa + hemicelulosa, ^bEficiencia de degradación de lignina, ^cRelación de $\eta_{lig} / \eta_{(c+h)}$, ^d Eficiencia de FES= [(degradación de lignina) / (degradación de hemicelulosa + celulosa)]* 100. Los datos representan la media ± desviación estándar.

El valor de E_{FES} (14.24 %) del rastrojo de avena y (9.38 %) del salvado de trigo indicó que se degradó 0.14 g y 0.09 g de lignina por 1 g degradado de ‘celulosa + hemicelulosa’ a los 16 de días de incubación. Esto es congruente con las eficiencias de degradación e indicador ε , lo cual se especulaba debido a que *A. terreus* tiene una amplia producción de enzimas para degradar ‘celulosa + hemicelulosa’, pero estas cepas no se reportan como ligninolíticas (Kumar y Parikh, 2015). Además, nuestros resultados coinciden con los de

Azlan *et al.* (2018), quienes reportan una eficiencia de degradación de ‘celulosa + hemicelulosa’ de 20.5 % con *A. terreus* y rastrojo de arroz como sustrato de FES.

6.1.3. Producción de lovastatina

La producción de Lv en FES durante 16 días de incubación se muestra en la Figura 6. Aunque el salvado de trigo tuvo mejor composición nutricional esto no se proyectó en mayor rendimiento de Lv. La cepa *A. terreus* CDBB H-194 con rastrojo de avena como sustrato, a los 16 días de incubación obtuvo el mayor rendimiento de ambas cepas y sustratos (23.8 mg/g de MS; Figura 6a). No obstante, la producción de Lv con la misma cepa (CDBB H-194) y salvado de trigo fue tres veces menor (6.8 mg/g de MS; Figura 6b). El alto rendimiento de Lv en este experimento podrían deberse por una parte a la composición del medio de FES (materiales y métodos, sección 6.1).

Primero, se utilizó glicerol, al respecto Zhang *et al.* (2015) reportaron que este compuesto induce a un proceso de FES más robusto y resistente a la represión catabólica también, provoca un mejor ambiente para el crecimiento de los hongos y colonización del sustrato. Por otra parte, la suplementación con metionina en el medio de FES fue otro factor determinante, debido a que un compuesto intermediario para biosíntesis de Lv (dihidromonacolina L) se deriva de la metionina. En este contexto, Rollini y Mazoni (2006) evaluaron la producción de Lv en FES con *A. terreus* y adicionaron metionina al medio de cultivo (0.01 g/L), esto aumentó 20 % la producción de Lv respecto al medio control. En este contexto, los resultados del tratamiento CDBB H-194 y rastrojo de avena en nuestro experimento superan otros experimentos similares, por ejemplo, Gulyamova *et al.* (2013) reportó rendimientos de Lv 9.5 y 8.4 mg/g de MS con dos cepas de *A. terreus*, y avena como sustratos de FES, respectivamente.

La combinación de la cepa CDBB H-1976 y salvado de trigo resultó en el segundo mejor rendimiento de Lv (9.1 mg/g MS) a los 12 días (Figura 6b). Este resultado coincide con los de Patil *et al.* (2011) quienes también realizaron FES de salvado de trigo y *A. terreus* obteniendo un rendimiento máximo de Lv (12.5 mg/g MS) a los 10 días de incubación.

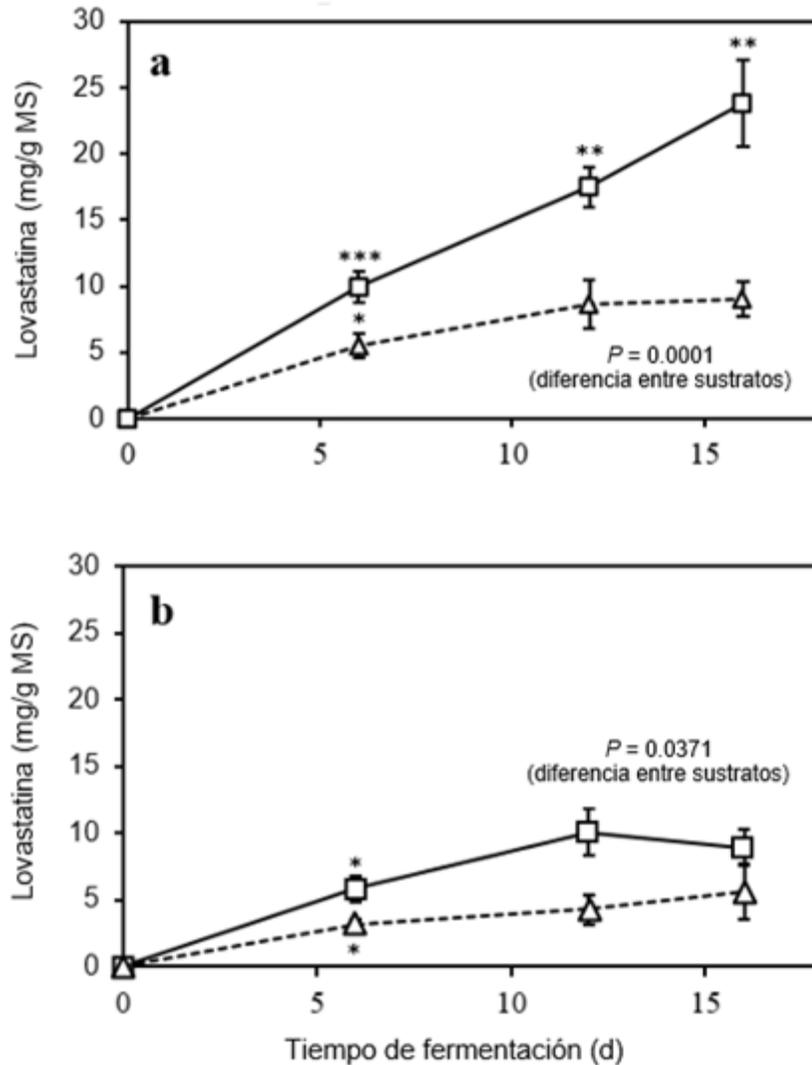


Figura 6. Producción de lovastatina en FES: (a) *A. terreus* CDBB H-194 y (b) *A. terreus* CDBB H-1976. □, rastrojo de avena; △, salvado de trigo. Los datos representan la media ± desviación estándar. Los asteriscos en líneas indican significancia de acuerdo con la prueba de Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$).

La cepa CDBB H-1976 con el rastrojo de avena obtuvo el mayor rendimiento de Lv (5.7 mg/g MS) a los 16 días (Fig. 6b). Estudios previos han demostrado la importancia de genes y enzimas claves en la biosíntesis de Lv. Bhargavi *et al.* (2014) demostraron que la homología de genes involucrados en la síntesis de Lv fue mayor con una cepa de *A. terreus* aislada del suelo que de una cepa *A. terreus* endofítica.

En este trabajo, la cepa CDBB H-194 fue aislada del suelo mientras la cepa CDBB H-1976 se aisló de pacientes con aspergilosis pulmonar. Una posible explicación del bajo rendimiento de Lv en la cepa CDBB H-1976 puede atribuirse a la ausencia de genes involucrado en la biosíntesis de Lv más que factores fisiológicos y ambientales (Bhargavi *et al.*, 2017).

Los coeficientes de determinación R^2 demostraron (0.8453-0.9914, rango de R^2 , Anexo Cuadro A2) que las regresiones del modelo cinético de orden cero se adecuaron a los datos experimentales (rendimientos finales de Lv). Esto es consistente con Levenspiel (2004), quien observó que este modelo generalmente se ajusta a patrones cinéticos en sistemas donde la concentración inicial del sustrato de fermentación es muy alta, como son los contenidos de 'celulosa + hemicelulosa' de este experimento (Cuadro 7).

6.2. Actividad 2. Efecto del rastrojo de avena fermentado como portador de lovastatina sobre la producción de metano ruminal

6.2.1. Análisis bromatológico de las dietas experimentales

El Cuadro 8 muestra las proporciones de RAF como portador de Lv en las dietas experimentales, así como la composición bromatológica de cada tratamiento. El contenido de proteína cruda, cenizas, FDN y FDA no mostró cambios cuando se mezcló el RAF en la dieta para bovinos productores de carne en comparación con el control.

Cuadro 8. Composición bromatológica de las dietas experimentales con rastrojo de avena fermentado.

| Ingrediente (g/kg MS) | Lovastatina (mg/L) | | | |
|------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 |
| Maíz molido | 566 | 566 | 566 | 566 |
| Soya | 120 | 120 | 120 | 120 |
| Urea | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Mezcla mineral + vitaminas | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Rastrojo de avena | 284 | 189 | 95 | 0 |
| Rastrojo de avena fermentado | 0 | 95 | 189 | 284 |
| Composición química (% MS) | | | | |
| Materia Orgánica | 90.37 | 90.03 | 90.10 | 89.38 |
| Proteína Cruda | 12.01 | 12.62 | 12.35 | 13.70 |
| Cenizas | 5.25 | 5.53 | 5.73 | 6.01 |
| FDN ^a | 58.08 | 60.18 | 65.34 | 59.69 |
| FDA ^b | 13.48 | 13.38 | 13.12 | 13.04 |

^aMezcla mineral; Ca, 30%; P, 1.00%; Na, 7.00%; K, 0.10%; S, 150 ppm; Fe, 720 pp; Mg, 720; Cu, 285 ppm; Zn, 720 ppm; I, 8 ppm; Co, 2 ppm; Se, 5 ppm. ^bfibra detergente neutro; ^cfibra detergente ácido.

Este análisis demuestra que las proporciones de RAF (9.5, 18.9 y 28.4 %) no afecta los principales nutrientes de la dieta experimental. Esto es de gran importancia porque se espera modificaciones mínimas cuando se formulen raciones para bovinos considerando el RAV como estrategia para mitigar las emisiones de metano ruminal (Gerber *et al.*, 2013).

6.2.2. Efecto del rastrojo de avena fermentado sobre la producción de metano ruminal y ácidos grasos volátiles

Los efectos del RAF como portador de Lv sobre la PGT, metano, hidrógeno y AGV se muestran en el Cuadro 8. La PGT fue menor en los tratamientos 100 y 150 mg/L respecto al control ($P < 0.05$).

La mitigación de metano fue similar en los tratamientos RAF concentraciones de Lv 100 y 150 mg/L, ambos mostraron niveles de inhibición de aprox. 38 % comparados con el control. Cabe resaltar que los resultados anteriores coinciden con los reportes por Soliva *et al.* (2011) quienes confirmaron hasta 40 % de inhibición de la producción de CH₄ ruminal, donde emplearon el sistema RUSITEC, fluido ruminal de una vaca lechera, una dieta experimental a base de heno de centeno, cebada, soya, y una única dosis de Lv pura (150 mg/L).

En este contexto, dosis bajas de Lv (5 y 3.2 mg/L) no demuestran efectos inhibitorios sobre la producción de metano ruminal *in vitro* de dietas relación f:c 50:50 y fluido ruminal como inóculo (Busquet *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2014). Sin embargo, Jahromi *et al.* (2013) señalaron que el rastrojo de arroz fermentado como portador de Lv (dosis 4.43 mg/L de medio de cultivo) disminuyó la PTG y CH₄ en 21 % y 16 % ($P < 0.01$) usando este rastrojo fermentado como único sustrato para la fermentación ruminal *in vitro*.

Por otra parte, la producción de hidrógeno en el espacio gaseoso incrementó significativamente (3 y 8 veces respecto al control, Cuadro 9) en los tratamientos 100 y 150 mg/L. La metanogénesis ruminal es la principal ruta aceptora de H₂, por lo tanto, una vez que se inhibió la población de metanógenos del rumen, una parte del H₂ producido durante la fermentación ruminal se acumuló en el espacio gaseoso. Esto se ha reportado en consorcios donde se inhibe la metanogénesis (Martínez-Fernández *et al.*, 2016).

Cuadro 9. Efecto del rastrojo de avena fermentado como portador de lovastatina sobre la producción de gas total, metano, hidrógeno y ácido grasos volátiles

| Variable | Lovastatina, mg/L | | | | EEM ^a | P-value |
|-----------------------------|-------------------|---------|----------|----------|------------------|---------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | | |
| PGT ^b , SmL | 133.63a | 112.24b | 102.37cb | 104.26cb | 8.57 | 0.007 |
| CH ₄ , SmL | 44.86a | 33.57ba | 27.26bc | 28.13bc | 3.53 | 0.001 |
| H ₂ , mmol | 1.32a | 6.08b | 13.52c | 10.68c | 1.55 | 0.001 |
| pH | 5.9 | 6.1 | 6.0 | 5.9 | 0.13 | 0.349 |
| Total AGV ^c , mM | 106.67a | 92.31ab | 76.8b | 76.57b | 11.76 | 0.058 |
| VGA, mol/100 mol | | | | | | |
| Acetato | 66.36a | 65.03ba | 56.10c | 58.03bc | 2.8 | 0.005 |
| Propionato | 17.83a | 19.60a | 22.86b | 23.30b | 1.58 | 0.001 |
| Butirato | 11.60 | 10.10 | 12.96 | 12.63 | 1.75 | 0.260 |
| Valerato | 3.6a | 3.8ba | 6.3c | 5.8bc | 0.97 | 0.019 |
| A:P relación ^d | 3.7a | 3.3ba | 2.4bc | 2.5c | 0.32 | 0.003 |

^aError estándar de la media, ^bproducción de gas total, ^cácidos grasos volátiles, ^d relación acetato/propionato. abc medias con diferente literal en hilera son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Al respecto, Guyader *et al.* (2016) reportaron que cuando se inhibió la metanogénesis ruminal *in vitro* (P < 0.01) de una dieta relación f:c (50:50) con nitrato, la acumulación de H₂ en el espacio gaseoso fue 7 veces mayor respecto al control.

La concentración total de AGV al final de la fermentación ruminal de los tratamientos con 100 y 150 mg/L fueron significativamente menores (28 %) comparados con el control ($P < 0.05$, Cuadro 8). El tratamiento con Lv 50 mg/L no tuvo diferencias en la concentración total de AGV con respecto al control.

La proporción molar de acetato fue menor 14 % en los tratamientos Lv 100 y 150 mg/L ($P < 0.05$) mientras que las proporciones molares de propionato y valerato de estos tratamientos incrementaron ($P < 0.01$) comparado con el control. Así, la relación acetato/propionato fue disminuida en los dos tratamientos ($P < 0.05$). Ningún tratamiento afectó la proporción molar de butirato ($P > 0.26$).

La inhibición de la metanogénesis implicaría la existencia de rutas alternas para el flujo de electrones, la producción de propionato a nivel ruminal es una de estas rutas (Weimer, 1998). Lo anterior pudo ocurrir en los tratamientos con Lv 100 y 150 mg/Lv donde la proporción molar de propionato aumentó significativamente. Esto también se sustenta con los resultados de Ungerfeld (2015) y Capelari y Powers (2017) quienes reportaron un incremento significativo en la proporción molar de propionato en fermentaciones ruminales *in vitro* cuando la producción de metano fue mitigada significativamente.

6.3. Actividad 3. Inhibición *in vitro* de la metanogénesis ruminal de una dieta alta en grano con lovastatina

6.3.1. Determinación de lovastatina en forma lactona y β -hidroxiácido

El análisis de HPLC (Figura 7a) permitió determinar que la Lv pura inicialmente contenía 96.0 % en forma LA y posterior a su hidrólisis alcalina (Figura 7b), se obtuvo 58.8 % de forma HI. Con base en lo anterior, se estableció que el tratamiento anti metanogénico con Lv pura (300 mg/L) equivalió a 176.5 mg/L en forma HI. Estos resultados coinciden con los reportados por Beltrán *et al.* (2019) quienes reportan que la hidrólisis de Lv pura a pH 12.5 (0.1 M NaOH) e incubada a 37°C/12 h, generó aproximadamente 50 % de su forma HI. Así, este trabajo reporta por primera vez la hidrólisis y cuantificación de la Lv en forma β -hidroxiácido como tratamiento para mitigar la metanogénesis ruminal.

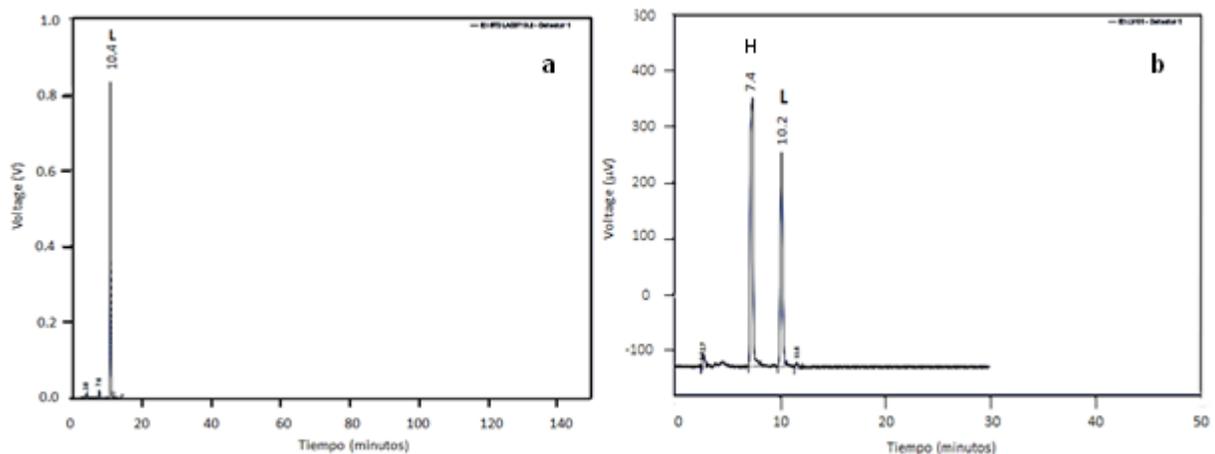


Figura 7. Cromatograma de HPLC de la muestra de LOV antes de hidrolizar (a) y después de su hidrolisis (b). Los picos representan: (H) LOV forma β -hidroxiácido y (L) en forma lactona.

6.3.2. Cinética de producción de gas total y metano

La Figura 8 muestra la PGT del CON y de los tratamientos Lv, BES y MON, a las 12, 24, 36, 48 h de incubación. Al tiempo 12 h, la Lv y el CON tuvieron un comportamiento similar, pero

a partir de las 24 h, la Lv presentó una disminución sobre la PGT que mantuvo hasta el término del muestreo. Los tratamientos MON y BES presentaron una disminución sobre la PGT a partir de las 12 h, esta tendencia se mantuvo hasta el final de la incubación.

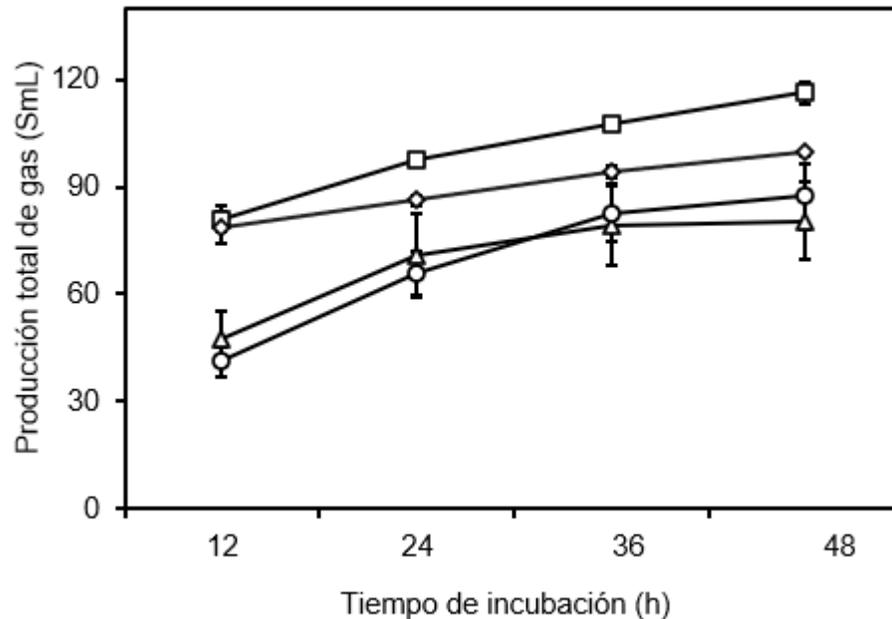


Figura 8. Producción de gas total *in vitro* de una dieta para bovinos de carne alta en grano. □, control; Δ, ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ○, monensina (6 mg/L); ◇, lovastatina (300 mg/L).

Como se observa en la Figura 9, los tres tratamientos tuvieron un efecto anti metanogénico a partir de las 12 h de incubación. La MON y BES obtuvieron la mayor inhibición de metano entre las 24 y 36 h de incubación mientras que la LOV la obtuvo a las 12 h.

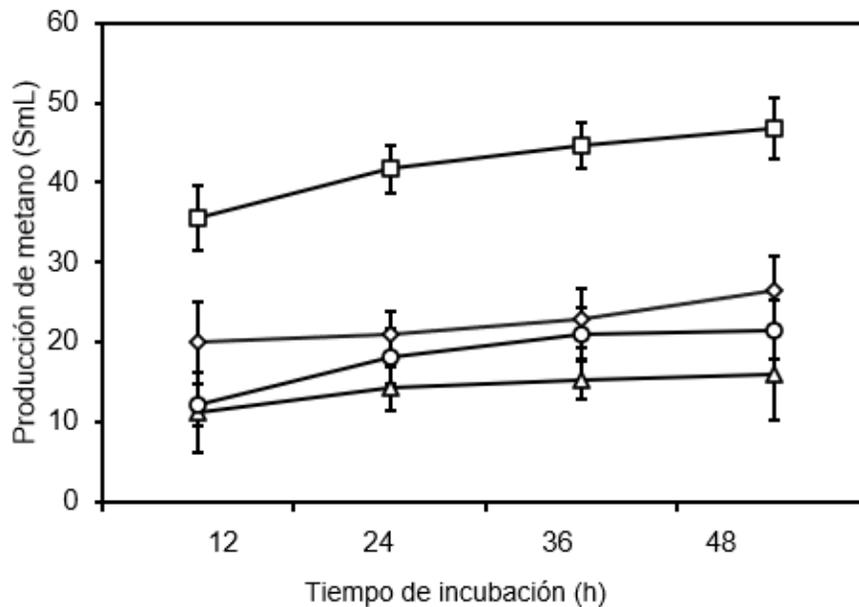


Figura 9. Producción de metano ruminal *in vitro* de una dieta alta en grano para bovinos de carne. □, control; △, ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ○, monensina (6 mg/L); ◇, lovastatina (300 mg/L).

A la fecha, esta es la primera vez que se presenta la cinética de PGT y CH₄ ruminal *in vitro* asociado al efecto anti metanogénico de la Lv pura. En este contexto, únicamente se ha reportado la producción *in vitro* de gas o metano acumulados al tiempo final de incubación (Busquet *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2013; Soliva *et al.*, 2011).

6.3.3. Variables de fermentación ruminal

Los variables de fermentación ruminal evaluadas al tiempo final de muestreo (48 h) se presentan en el Cuadro 10. La PGT fue significativamente menor en los tres tratamientos con respecto al control. La inhibición de metano con LOV y MON fue de 43.56 y 53.54 %, respectivamente ($P < 0.05$). El BES demostró el mejor efecto anti metanogénico con aproximadamente 61.66 %.

Cuadro 10. Efecto de la lovastatina, monensina sódica y ácido bromoetano sulfónico sobre la fermentación ruminal *in vitro*

| Variable | Tratamiento | | | | EEM ⁵ | P-value |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| | CON ¹ | LOV ² | MON ³ | BES ⁴ | | |
| Gas total, SmL | 116.50a | 99.57b | 87.28bc | 80.54c | 7.1 | 0.0012 |
| CH ₄ , SmL | 47.53a | 26.74b | 21.91bc | 18.03c | 3.3 | <.0001 |
| J ⁶ , % | 0.00 | 43.56a | 53.54b | 61.66b | 4.8 | 0.0104 |
| pH | 6.1 | 6.2 | 6.1 | 5.9 | 0.2 | 0.5597 |
| AGV, mM | 83.50a | 78.00a | 60.50c | 92.01b | 5.5 | 0.0006 |
| AGV, mol/100mol | | | | | | |
| Acetato | 59.49a | 60.66a | 46.56b | 57.2a | 2.7 | 0.0007 |
| Propionato | 26.86a | 28.37a | 37.01b | 27.50a | 2.1 | 0.0009 |
| Butirato | 12.10a | 10.60a | 15.26b | 14.83b | 1.6 | 0.0223 |
| A/P ⁷ | 2.27a | 2.14a | 1.32b | 2.08a | 0.3 | 0.0030 |

a,b,c Medias con distinta letra en una fila son diferentes ($p < 0.05$). ¹control; ²lovastatina (300 mg/L); ³monensina (6 mg/L); ⁴ácido bromoetano sulfónico (20 mg/L); ⁵error estándar de la media, ⁶ Inhibición de la metanogénesis respecto al control; ⁷relación acetato/propionato.

Al respecto, Busquet *et al.* (2005) y O'Brien *et al.* (2014) evaluaron dosis bajas de Lv pura (5 y 3 mg/L), ambos ensayos con una dieta relación f:c de 50:50 y fluido ruminal de bovinos como inóculo. Sus resultados no mostraron efectos significativos sobre la mitigación de metano. Esto probablemente se deba a que la dosis de Lv evaluadas fueron muy bajas (< 5 mg/L) las cuales, se basaron en el trabajo de Miller y Wollin (2001). Sin embargo, este último trabajo se realizó con cepas puras de metanógenos en medio líquido. Esto sugiere

inicialmente efectos de la concentración de sólidos (dieta experimental y fluido ruminal) en el medio de cultivo relacionados con la efectividad de la Lv. Lo anterior coincide con el trabajo de Soliva *et al.* (2011) quienes reportaron una disminución de metano ruminal de ~ 40 %, con una dosis de Lv mayor a 30 veces a los trabajos anteriores donde, se utilizó una dieta relación f:c (50:50) y fluido ruminal de bovinos.

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

Existen algunas técnicas para hidrolizar la Lv a su forma activa HI (Klingelhöfer y Morlock, 2019). Sin embargo, los experimentos sobre fermentación ruminal a corto plazo no reportan cuanta Lv se administra en su forma HI (Busquet *et al.*, 2005; Soliva *et al.*, 2011; O'Brien *et al.* 2014). Además de la hidrólisis química, la microbiota (heces de seres humanos) puede catalizar la conversión Lv a su forma HI (Demonfort-Nkamga *et al.*, 2017). No obstante, se ha reportado que este proceso puede ocurrir en agua, después de 2 días de incubación, pH 7 y 37°C, sin actividad microbiana (Beltrán *et al.*, 2019). Lo anterior puede ser clave para establecer los efectos de Lv sobre fermentaciones ruminales a corto plazo. De esta manera, los resultados satisfactorios de Soliva *et al.* (2011) obtenidos en experimentos de inhibición de la metanogénesis ruminal con Lv pura pudieran estar influidos por la hidrólisis de este compuesto, dado que su incubación fue a largo plazo (10 días), lo cual concuerda con la hidrólisis microbiana o química descrita anteriormente.

Los tratamientos MON y BES se comparan favorablemente con investigaciones previas. Primero, Capelari y Powers (2017) evaluaron el efecto de la MON (6 mg/L) en una

fermentación ruminal *in vitro* donde utilizaron una dieta alta en grano y fluido ruminal de bovinos, los resultados demostraron que la producción de gas disminuyó a las 24 y 48 h de muestreo mientras que la producción de metano disminuyó significativamente en todos los tiempos de muestreo (4, 8, 12, 24, y 48 h). Lee *et al.* 2009 evaluaron el efecto del BES (10.5 mg/L) sobre la fermentación ruminal *in vitro* de una dieta relación f:c de 60:40 y fluido ruminal de bovinos, de este modo la producción de gas disminuyó en todos los tiempos de muestreo, además resulta interesante destacar que la mitigación de metano asociado al BES fue mayor a 95 % en todos tiempos de muestreo (24, 48 y 72 h).

La producción de AGV del tratamiento Lv no mostró diferencias significativas comparado con el control (Cuadro 10), así como también, sobre la proporción de acetato, propionato y butirato. Estos resultados coinciden con los reportados por Soliva *et al.* (2011) quienes demostraron que cuando la Lv inhibió ($P < 0.05$) la metanogénesis *in vitro*, la concentración total de AGV no se fue afectada, tampoco las proporciones de acetato y butirato, aunque reportaron una disminución de propionato.

Generalmente, la mitigación de metano ruminal está asociada con un aumento de propionato (como aceptor de H_2), a pesar de esto, existe en el rumen otras rutas metabólicas donde el H_2 es donador de electrones e.g. fumarato a succinato, piruvato a lactato, síntesis de biomasa y la biohidrogenación (Ungerfeld, 2020). Estas rutas alternas podrían ser utilizadas cuando la Lv inhibe la metanogénesis ruminal, dado que solo se han reportado ligeros cambios en la concentración y perfil AGV en experimentos *in vitro*. Una ventaja de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (Lv y simvastatina) como aditivo anti metanogénico es su especificidad sobre arqueas metanogénicas (Gottlieb *et al.*, 2016).

El total de AGV y la concentración de acetato del tratamiento MON disminuyeron ($P < 0.05$), pero aumentó la proporción tanto de propionato y butirato. Así, la relación acetato/propionato disminuyó ($P < 0.05$).

Los efectos de la MON sobre la fermentación ruminal han sido evaluados más ampliamente (Ranga *et al.*, 2013). Con respecto a la metanogénesis, la MON afecta a las bacterias productoras de hidrógeno (Russell, 1987). Además, la MON está relacionada con cambios establecidos sobre el perfil metabólico a nivel ruminal donde resalta un aumento de propionato (Bagheri *et al.*, 2018). No obstante, se ha indicado que el uso de la MON en dietas altas en almidón determinados microorganismos (*e.g. P. bryantii*) involucrados en la generación de H_2 no son susceptibles a este ionóforo (Weimer *et al.* 2008). Además, la MON puede afectar a las bacterias (*M. elsdenii* y *B. fibrisolvans*) involucradas en la biohidrogenación de lípidos (Weimer *et al.*, 2008).

El tratamiento BES tuvo una disminución significativa sobre el total de AGV y únicamente tuvo un aumento significativo sobre la concentración de butirato (Cuadro 10). Resultados similares fueron reportados por Lee *et al.* (2009) quienes en experimentos de fermentación ruminal *in vitro* con BES (10.5 mg/L) indicaron que este compuesto no tiene efecto sobre el total de AGV, pero disminuye la proporción molar de acetato, presenta ligeros cambios sobre el propionato y un aumento sobre la proporción de butirato ($P < 0.05$).

6.4. Actividad 4. Caracterización de comunidades microbianas del rumen

6.4.1. Efecto de la concentración de lovastatina sobre alfa diversidad

Los índices de diversidad Shannon y Simpson; de riqueza, Chao 1; de igualdad Pielou y Faith, y el número de OTUs demostraron que no existen diferencias significativas entre el tratamiento con RAF (Lv, 150 mg/L), el control, y el inóculo (Figura 10), aun cuando se inhibió la metanogénesis significativamente.

El número OTUs observadas fue de 783, 687, y 743 para el inóculo, el control y el tratamiento RAF, respectivamente. El rango del índice Chao 1 fue de 687 a 779, su tendencia, así también de los índices Faith y Shannon fueron paralela a los valores del número de OTUs.

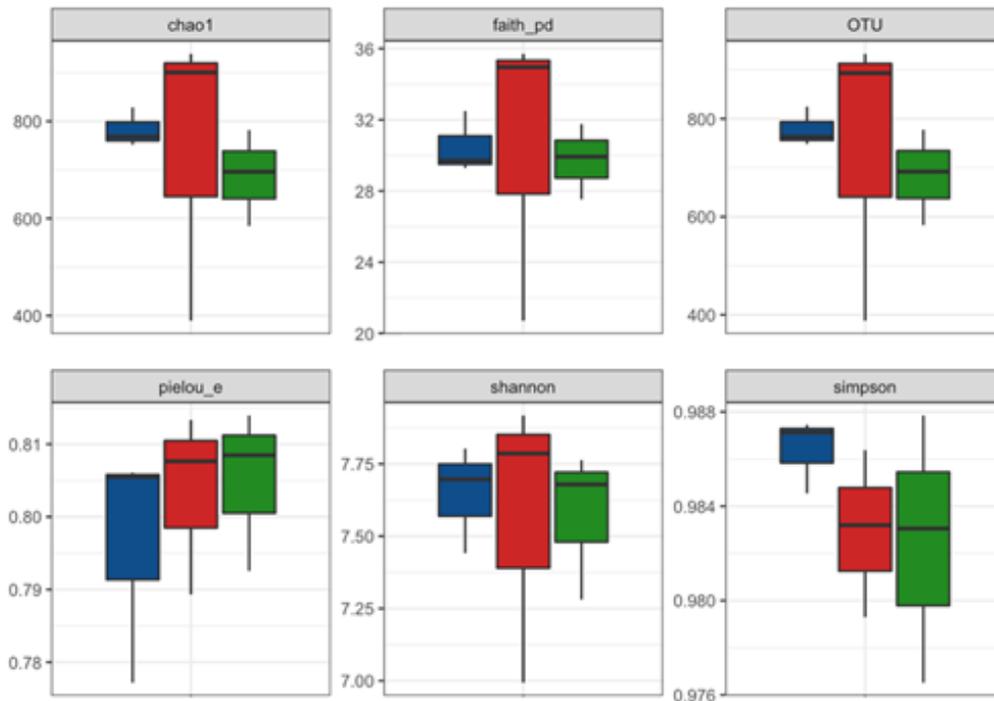


Figura 10. Índices de diversidad alfa de los tratamientos: inóculo, azul; control, rojo; y RAF (Lv, 150 mg/L), verde.

El índice Shannon basado en el \log_{10} fue del orden de 7.6, el valor más alto correspondió al control, lo que muestra una alta diversidad microbiana. Los valores del índice Simpson tuvieron un alto rango (0.983 a 0.987), lo que también designó alta diversidad entre los tratamientos. El índice de Pielou se encontró en un estrecho intervalo de 0.805 a 0.808, puesto que el valor 1 indica perfecta uniformidad, estos valores denotaron un alto grado de equidistribución de los grupos microbianos en las muestras (Magurran, 2004).

Los resultados de este experimento son consistentes con los de Zhou *et al.* (2020) quienes evaluaron el efecto de aceites esenciales de orégano como tratamiento anti metanogénico, sus resultados sugirieron que cuando se inhibió la producción de metano ($P < 0.05$), no hubo cambios en los índices de diversidad: Shannon (8.01 – 8.12), Simpson (0.99 – 0.99), Chao 1 (1979 – 1928), así como también en el número de OTUs (1297 – 1323) para el control y tratamiento, respectivamente.

6.4.2. Efecto de la concentración de lovastatina sobre la beta diversidad

El análisis de beta diversidad usando PCA (distancias ponderadas UniFrac) reveló que la distancia media entre el control, inóculo, tratamiento RAF (Lv, 150 mg/L) no tuvo separación de conglomerados definidos, lo que sugiere que el tratamiento RAF no tiene efecto sobre la beta diversidad (Figura 11a). Lo anterior también se sostiene en el diagrama de Venn (Figura 11 b), el cual sugirió que el inóculo, control y tratamiento con Lv comparten la mayoría de los microorganismos.

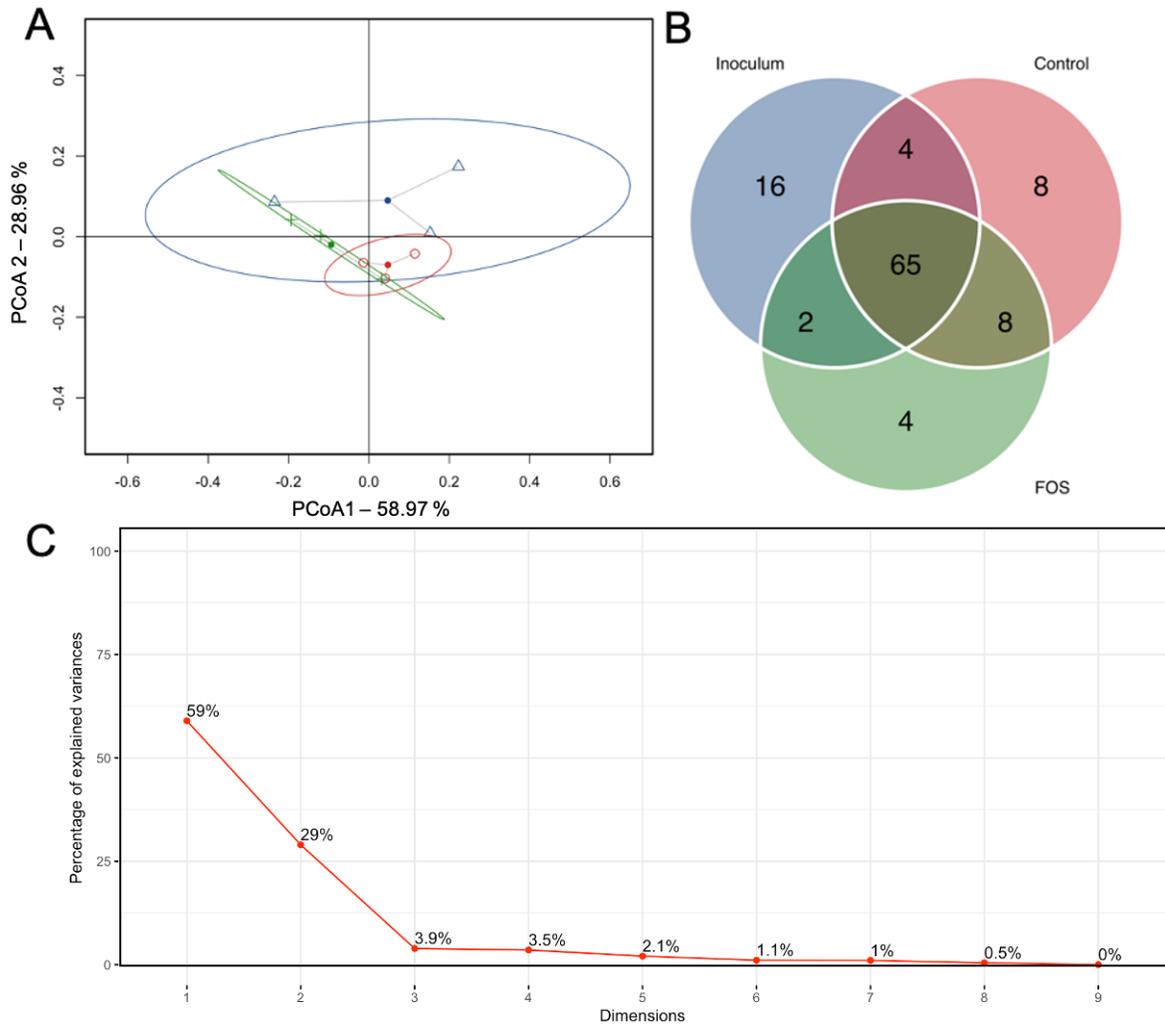


Figura 11. Beta diversidad. A) Análisis de componentes principales generado de la distancia ponderada UniFrac entre los tratamientos: inóculo, azul; control, rojo; y RAF (Lv, 150 mg/L), verde. B) Diagrama de Venn. C) Porcentaje de variación explicado por componente.

El análisis anterior se relaciona estrechamente con el reporte de otro experimento basado en residuos agroindustriales (torta de palmiste) fermentados por *A. terreus* como portadores de Lv para suprimir la metanogénesis donde no se reportan cambios en la alfa y beta diversidad de la microbiota ruminal asociada a ese tratamiento (Candyrine *et al.*, 2018).

6.4.3. Efecto de la concentración de lovastatina sobre la abundancia relativa de la microbiota ruminal

La abundancia relativa de la microbiota ruminal a nivel de filo se muestra en la Figura 12. Se asignaron 19 filos, de los cuales *Bacteroidetes* y *Firmicutes* representan el 70 % del total de las secuencias. Estos resultados son consistentes con los de Wu *et al.* (2012) y Myer *et al.* (2016) quienes encontraron que ambos filos fueron predominantes en la microbiota ruminal de bovinos. Posteriormente, las muestras fueron representadas por los filos: *Verrucomicrobia* (~7 %), *Proteobacteria* (~6 %), *Euryarchaeota* (~2 %), *Tenericutes* (~2.1 %), y *Planctomicetes* (~1.6 %).

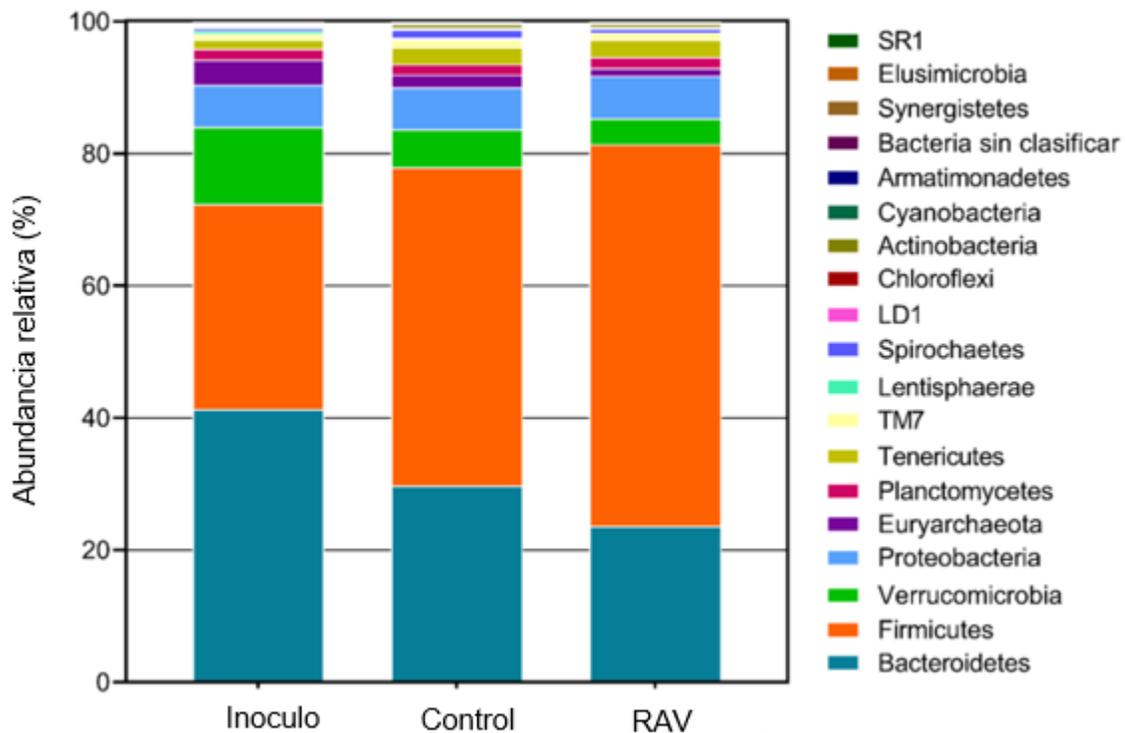


Figura 12. Abundancia relativa de arqueas y bacterias a nivel de filo de los tratamientos: inóculo, control, y RAF (Lv, 150 mg/L).

A nivel de filo, se observó un decremento en la abundancia de *Lentisphaerae* en el tratamiento RAF (Lv, 150 mg/L), lo que puede indicar una posible acidosis ruminal sub aguda (Mao *et al.*, 2013). Sin embargo, este tratamiento no tuvo efectos sobre el pH del medio ruminal ($P > 0.05$; Cuadro 9).

El 99 %⁺ de las AM correspondió al género *Methanobrevibacter* en todas las muestras, el cual pertenece al filo *Euryarchaeota*. El porcentaje de reducción de la abundancia relativa de *Euryarchaeota* entre el control y el tratamiento RAF fue obtenido con la siguiente ecuación (Ec. 9):

$$\eta_{c-t} = [(1.94 - 1.18)/1.94] * 100 = 39.17 \% \quad (9)$$

Donde η es % de reducción de abundancia relativa de *Euryarchaeota* entre el control (1.94) y el tratamiento RAF (1.18); c, abundancia relativa del control (1.18); t, abundancia relativa del tratamiento RAF.

Interesantemente, se observó una tendencia paralela entre los porcentajes de reducción de la abundancia relativa de *Euryarchaeota* (39 %) y de mitigación metanogénica (38 %). Desafortunadamente el EEM de la abundancia relativa fue alto 1.07 (Cuadro 11).

Con relación a otros grupos microbianos a nivel de género se observaron los siguientes cambios: *Prevotella* fue reducido ($P < 0.05$) en el tratamiento RAF. Este género está relacionado directamente con dietas altas en grano (Tao *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012), lo cual concuerda con la dieta experimental de nuestro experimento (Cuadro 7). La disminución de *Prevotella* puede interpretarse como resultado de la degradación de celulosa y hemicelulosa durante etapas temprana de la fermentación ruminal *in vitro* (Emerson y Weimer, 2017).

Cuadro 11. Abundancia relativa de bacterias y arqueas del rumen en el inóculo, control, y rastrojo de avena fermentado (Lv, 150 mg/L)

| Filo | Subclasificación | Tratamientos | | | EEM ^b | P-value |
|-----------------------|------------------------|--------------|---------|------------------|------------------|---------|
| | | Inóculo | Control | RAF ^a | | |
| Firmicutes | | 30.97a | 48.20ab | 54.48b | 10.89 | 0.0881 |
| | Order-Clostridiales | 16.54 | 18.84 | 17.55 | 3.90 | 0.7770 |
| | Other Firmicutes | 6.41a | 12.57a | 19.57b | 3.11 | 0.0062 |
| | Family-Ruminococcaceae | 5.78a | 9.80b | 13.71c | 1.08 | 0.0003 |
| | Succiniclasticum | 1.69a | 5.75b | 4.67ab | 1.93 | 0.0957 |
| | Ruminococcus | 0.55a | 1.22a | 2.30b | 0.52 | 0.0168 |
| Bacteroidetes | | 41.41b | 29.77a | 23.63ab | 7.85 | 0.0802 |
| | Other-Bacteroidetes | 23.26 | 18.93 | 18.61 | 5.23 | 0.5176 |
| | Prevotella | 18.14a | 10.83b | 5.02c | 3.14 | 0.0064 |
| Proteobacteria | | 6.42 | 6.36 | 6.43 | 1.46 | 0.9982 |
| | Pseudomonas | 5.35 | 4.61 | 4.52 | 1.54 | 0.7775 |
| | Other Proteobacteria | 1.07 | 1.75 | 1.90 | 0.62 | 0.2939 |
| Verrucomicrobia | | 11.69b | 5.71a | 3.89a | 1.46 | 0.0015 |
| Tenericutes | | 1.33a | 2.57b | 2.60b | 0.39 | 0.0123 |
| Euryarchaeota | | 3.72b | 1.94ab | 1.18a | 1.07 | 0.0665 |
| Planctomycetes | | 1.71 | 1.51 | 1.68 | 0.51 | 0.8833 |
| TM7 | | 0.95 | 1.20 | 1.02 | 0.25 | 0.4819 |
| Spirochaetes | | 0.44a | 1.28b | 0.63ab | 0.34 | 0.0525 |
| Actinobacteria | | 0.18a | 0.58b | 0.49b | 0.10 | 0.0068 |
| Lentisphaerae | | 0.43b | 0.25b | 0.04a | 0.10 | 0.0110 |
| Cyanobacteria | | 0.08 | 0.12 | 0.02 | 0.05 | 0.1280 |
| LD1 | | 0.25b | 0.10a | 0.03a | 0.04 | 0.0008 |
| Armatimonadetes | | 0.12 | 0.11 | 0.10 | 0.04 | 0.9556 |
| Chloroflexi | | 0.10 | 0.10 | 0.17 | 0.08 | 0.4817 |
| Bacteria unclassified | | 0.13 | 0.03 | 0.12 | 0.05 | 0.1628 |
| Synergistetes | | 0.00 | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.3456 |
| SR1 | | 0.00 | 0.03 | 0.03 | 0.24 | 0.2801 |
| Elusimicrobia | | 0.00 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.2676 |

^aRastrojo de avena fermentado (Lv, 150 mg/L), ^bError estándar de la media.

Se ha reportado que *Ruminococcus* es uno de los géneros celulolíticos predominantes en el rumen (Puniya *et al.*, 2015). Las abundancias de la familia *Ruminococcaceae* y el género *Ruminococcus* incrementaron 2.38 y 4.18 veces ($P < 0.05$) en el tratamiento RAF comparado con el control. Una de las ventajas del RAF como portador de Lv deriva de su producción con *A. terreus*, el cual produce enzimas fibrinolíticas (por ejemplo, xilanasas y celulasas) que podrían ayudar a la digestibilidad de sustratos lignocelulósicos (Facchini *et al.*, 2010). Además, exhibe mínimos riesgos a la salud (nivel de bioseguridad 1) y al medio ambiente (Prévot *et al.*, 2013).

6.4.4. Correlación de Spearman entre la microbiota ruminal y los metabolitos finales de fermentación ruminal

La Figura 13 muestra la correlación de Spearman entre la microbiota ruminal y los metabolitos finales de fermentación ruminal. Solo correlaciones significativas se discuten a continuación.

Euryarchaeota estuvo correlacionado negativamente ($P < 0.01$) con la producción de propionato y butirato mientras mantuvo una correlación positiva con la producción de CH_4 y acetato. La correlación significativa entre *Euryarchaeota* y metano fue reportada en experimentos con distintas dietas experimentales para bovinos (Danielsson *et al.*, 2017). La mayoría de las AM del rumen que metabolizan CO_2 e H_2 (metanogénesis a partir de la reducción de CO_2) corresponden al filo *Euryarchaeota* (Borrel *et al.*, 2016). Henderson *et al.* (2015) reportaron que *M. gottschalkii* y *M. ruminantium* fueron los dos metanógenos predominantes en muestras de fluido ruminal de bovinos, borregos, cabras y cérvidos, de un amplio rango de regiones geográficas. También, la correlación negativa de Spearman entre *Euryarchaeota* y los metabolitos butirato y propionato sostiene el concepto discutido

anteriormente sobre el propionato como una de las principales rutas alternas para consumir H₂ en el ecosistema ruminal.

El género *Prevotella* tuvo una correlación positiva con la producción de CH₄, AGV (P < 0.05) y PTG (P < 0.01). Como se mencionó anteriormente, *Prevotella* contribuye a la degradación de hemicelulosa en los alimentos, y generalmente sus metabolitos finales son el acetato, CO₂, e H₂ (Emerson y Weimer, 2017). Esta también fue sustentado con el reporte de Shen *et al.* (2017) quienes reportaron una correlación positiva entre *Prevotella* y la producción de CH₄, acetato, y butirato, cuando la metanogénesis ruminal *in vitro* fue inhibida con los tratamientos monensina y nisina (P < 0.05).

A pesar de la baja abundancia relativa de *Lentisphaerae*, ésta mantuvo una correlación positiva (P < 0.05) con la PGT y AGV. Este resultado podría deberse a la producción de enzimas hidrolasas glucosídicas de este género, lo que mejoraría le hidrólisis de polisacáridos de los alimentos y por consiguiente mayor producción de AGV y PGT (Kaoutari *et al.*, 2013).

Contrario a la expectativa, la familia *Ruminococcaceae* fue correlacionada negativamente (P < 0.05) con la PGT, CH₄, y AGV. La familia *Ruminococcaceae* incluye especies dominantes de bacterias celulolíticas (*R. flavefaciens* y *R. albus*) que producen AGV y sustratos consumidos durante la metanogénesis (Zhou *et al.* 2015). Así, se esperaría un desarrollo paralelo de *Ruminococcaceae* y una producción de metano más robusta. A pesar de esto, se ha demostrado que la familia *Ruminococcaceae* tiene una correlación negativa con la producción *in vitro* de CH₄ (Mi *et al.*, 2018).

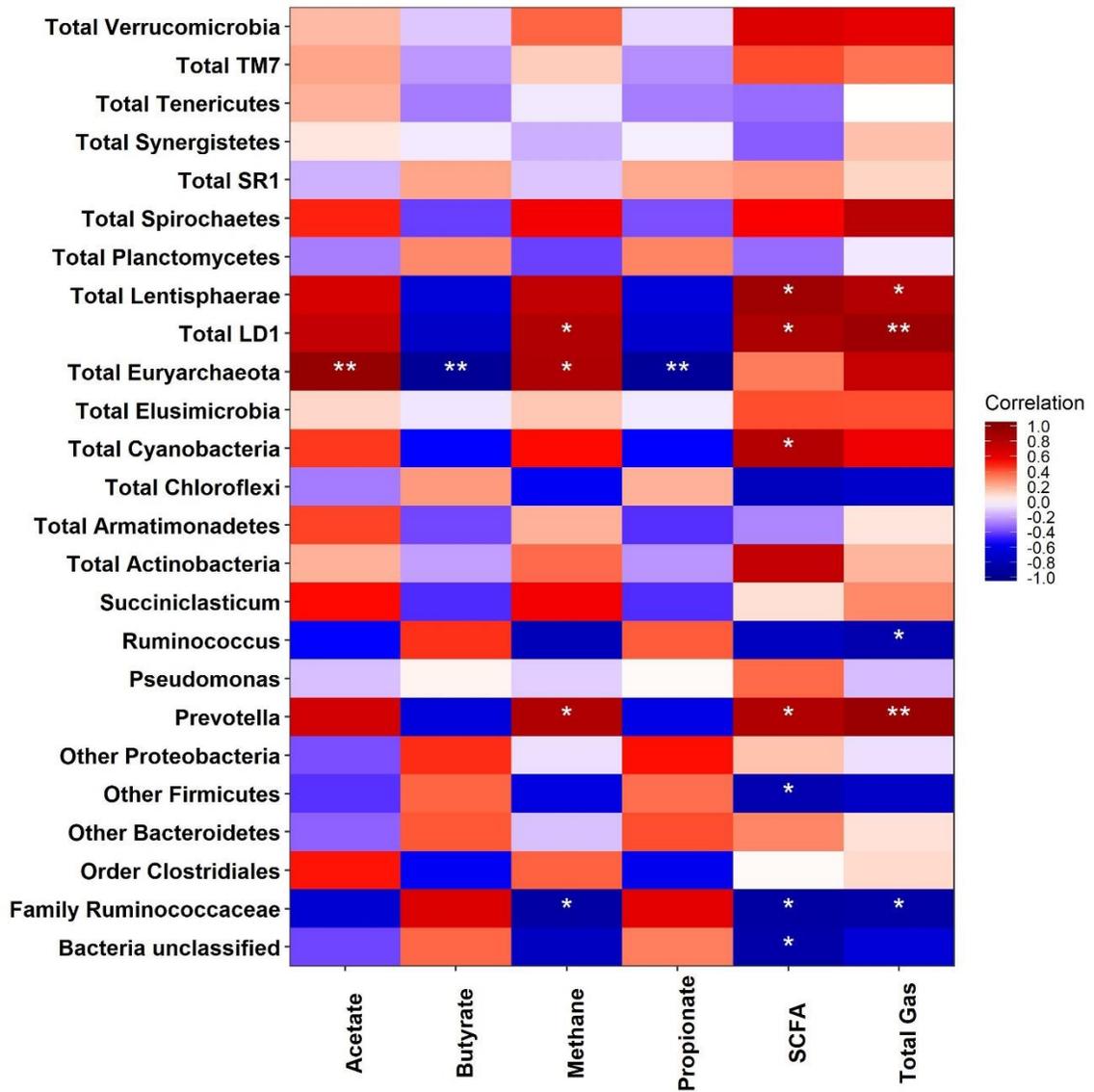


Figura 13. Correlación de Spearman entre la microbiota ruminal y los metabolitos finales de fermentación.

6.5. Actividad 5. Inhibición *in vitro* de metano en bovinos productores de leche

La Lv pura inhibió 27 % la metanogénesis de la dieta para bovinos productores de leche ($P < 0.05$). Por otra parte, la mitigación de CH_4 de la celulosa como sustrato fue de 50 % (Figura 14). Generalmente, las fermentaciones ruminales *in vitro* donde se inhibe la producción de metano con Lv muestran mayor efectividad con dietas basadas en granos y forrajes (Soliva *et al.*, 2011; Ábrego-García *et al.*, 2021) que aquellas donde utilizan un único ingrediente como sustrato (Jahromi *et al.*, 2013).

Además, la menor PGT y de metano a partir de la celulosa puede asociarse al cambio repentino del sustrato, lo que en principio desestabiliza la microbiota ruminal. Se espera que en las raciones mezcladas (grano y forraje) tengan mayor actividad fibrolítica y metanogénica (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). Sin embargo, el objetivo de la usar celulosa fue comparar la remoción de Lv con este sustrato y con una dieta para bovinos.

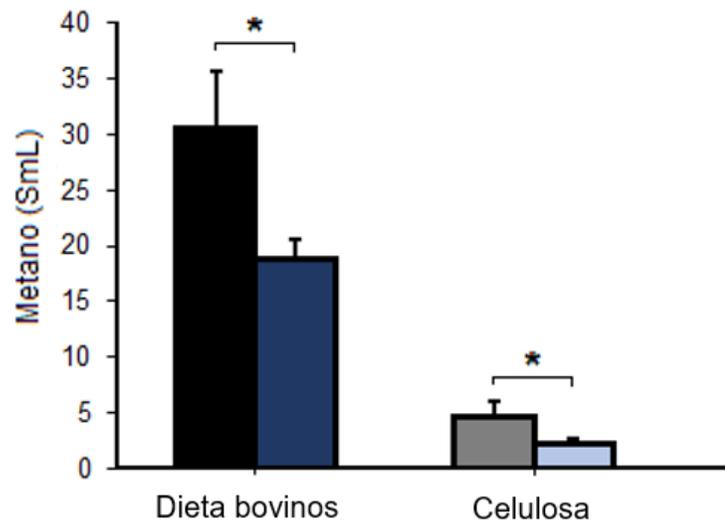


Figura 14. Producción de metano a 72 h incubación de una dieta para bovinos productores de leche (negro), dieta para bovinos productores de leche + Lv 300 mg/L (azul fuerte); celulosa (gris), celulosa + Lv 300 mg/L (azul claro). Los resultados expresan la media \pm D.E. * Indica diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$).

6.5.1. Producción de ácidos grasos volátiles

La producción total de AGV de la dieta para bovinos productores de leche no fue afectada por el tratamiento con Lv pura (Figura 15). Sin embargo, las proporciones molares de acetato, butirato y propionato cambiaron significativamente. Interesantemente, la proporción de acetato disminuyó durante todos los tiempos de muestreo 24, 48, y 72 h ($P < 0.05$) y la proporción de propionato tuvo un aumento significativo. El butirato aumentó a las 24 h ($P < 0.05$), pero no mantuvo esta tendencia en los tiempos 48 y 72 de incubación.

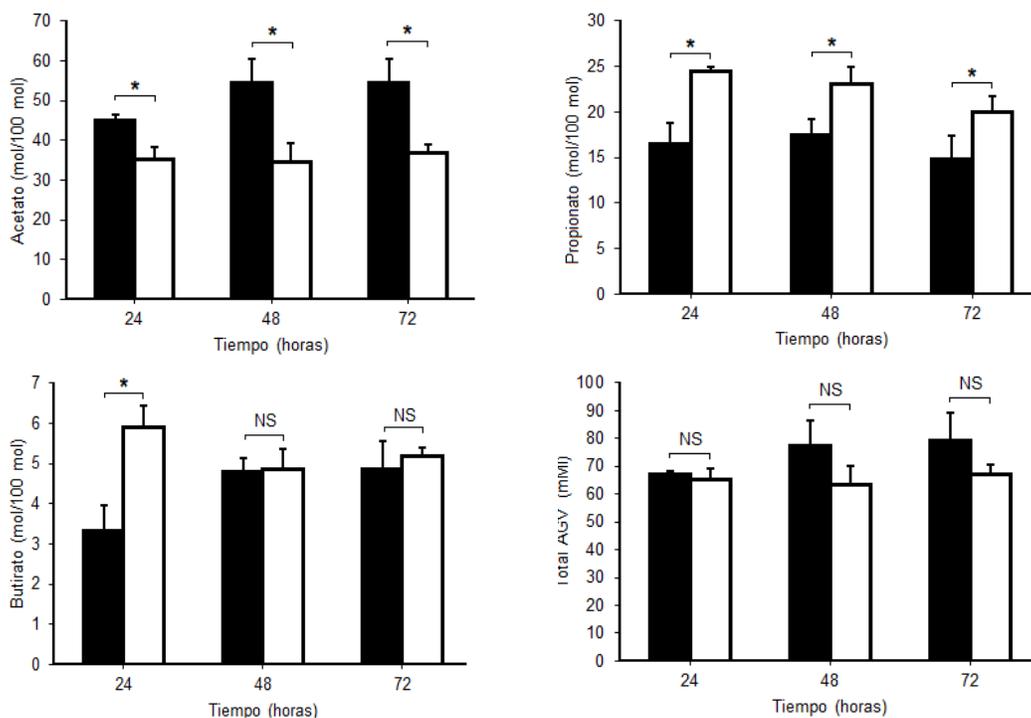


Figura 15. Producción de ácidos grasos volátiles de una dieta para bovinos productores de le leche (negro) y de la dieta para bovinos productores de leche + Lv 300 mg/L (blanco). Los resultados expresan la media \pm D.E. *Indica diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$).

Los cambios del perfil de AGV asociados a la Lv pura en la dieta alta en forraje (70 %) no fueron significativos cuando se empleó una dieta alta en grano (actividad 3). Esto puede

deberse a que la degradación ruminal del almidón es más rápida que los alimentos con alto contenido de lignocelulósico (Zicarelli *et al.*, 2011). Por lo tanto, los experimentos *in vitro* con dietas altas en forraje tendrían un patrón definido de fermentación más tardío y la posibilidad de modularse cuando paralelamente se inhibe la metanogénesis.

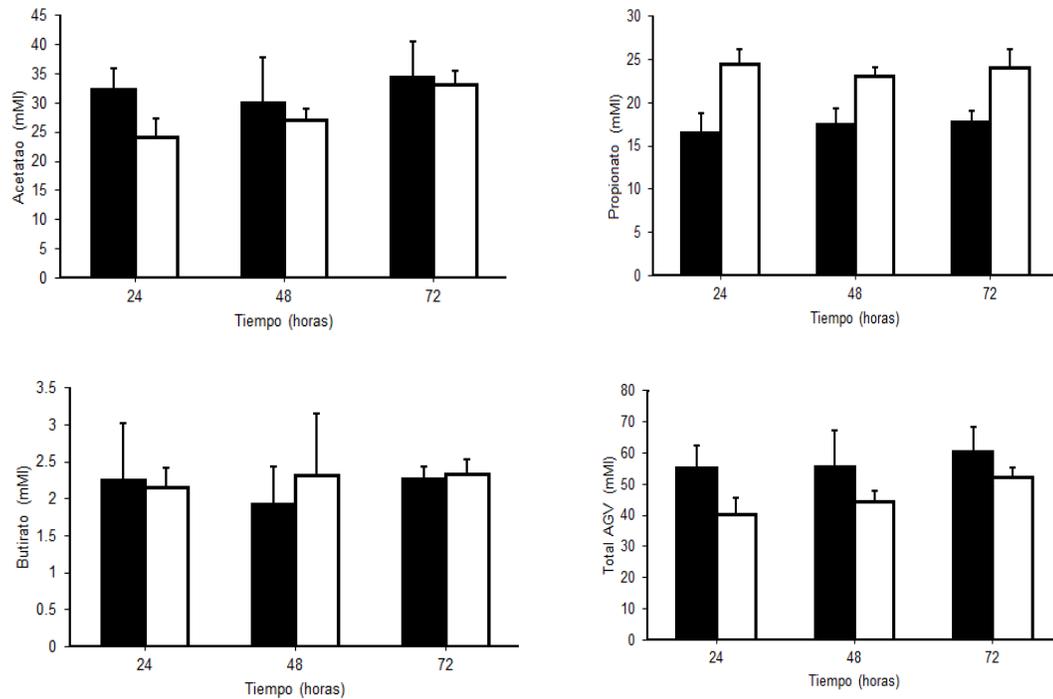


Figura 16. Proporción de ácidos grasos volátiles, celulosa (negro) y celulosa + Lv 300 mg/L (blanco). Los resultados expresan la media \pm D.E. * Indica diferencias significativas entre dos grupos ($P < 0.05$).

Cuando se usó celulosa como sustrato, la Lv pura no afectó tanto, la producción total de AGV, así como tampoco, las proporciones de acetato, propionato y butirato ($P > 0.05$) (Figura 16). Esto quizá resultó de una limitada actividad microbiana debido al estrés por el cambio súbito de sustrato, lo cual se discutió anteriormente. Nagadi *et al.* (2000) evaluaron los cambios de fermentación ruminal *in vitro* asociada al sustrato (celulosa, glucosa, y heno), con inóculo ruminal de ovinos con 3 regímenes alimenticios relación f:c de 20:80, 40:60, y

80:20. En general, observaron que cuando se usa celulosa como sustrato, los parámetros cinéticos de la fermentación ruminal disminuyeron significativamente.

El efecto de la Lv sobre los AGV a nivel ruminal no ha sido establecido. Por una parte, la Lv no mostró efectos significativos sobre el perfil de AGV en caprinos y ovinos (Klevenhusen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, Morgavi *et al.* (2013) demostraron una disminución de la proporción molar de acetato y un aumento de propionato y butirato. Por su parte, Ramírez-Restrepo *et al.* (2014) y Mohd *et al.* (2018) en experimentos realizados con bovinos y con caprinos respectivamente, reportaron únicamente una disminución significativa de butirato.

6.5.2. Remoción de lovastatina

La remoción de Lv fue mayor cuando se usó la dieta de bovinos productores de leche que con la celulosa como sustrato de fermentación (Figura 17).

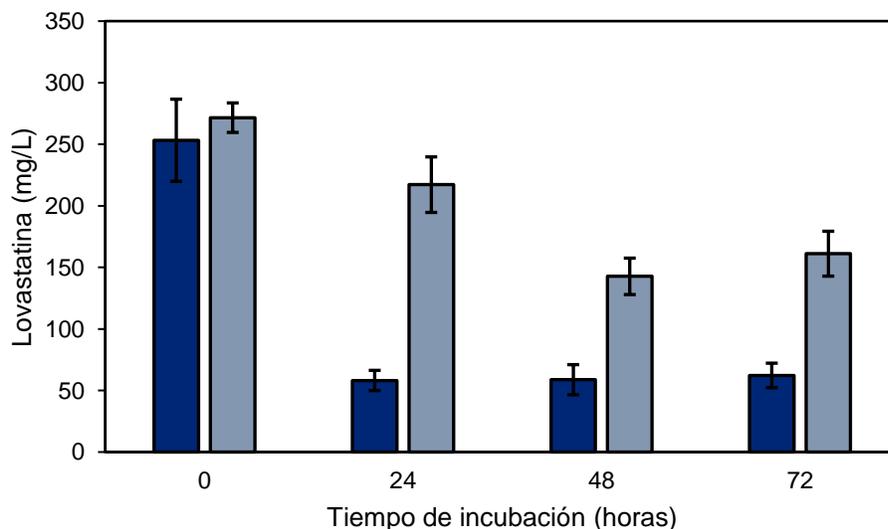


Figura 17. Remoción de Lv (300 mg/L) con dieta para bovinos productores de leche (azul fuerte) y celulosa (azul claro) como sustratos de fermentación ruminal. Los resultados se expresan como la media \pm D.E.

La remoción de Lv (72 %) en la dieta para bovinos tuvo fue mayor a las 24 h de incubación, posteriormente, no se observó mayor remoción en los tiempos 48 y 72 h. En contraste, la mayor remoción de Lv (48 %) cuando el sustrato fue celulosa se obtuvo a las 48 h (Figura 17).

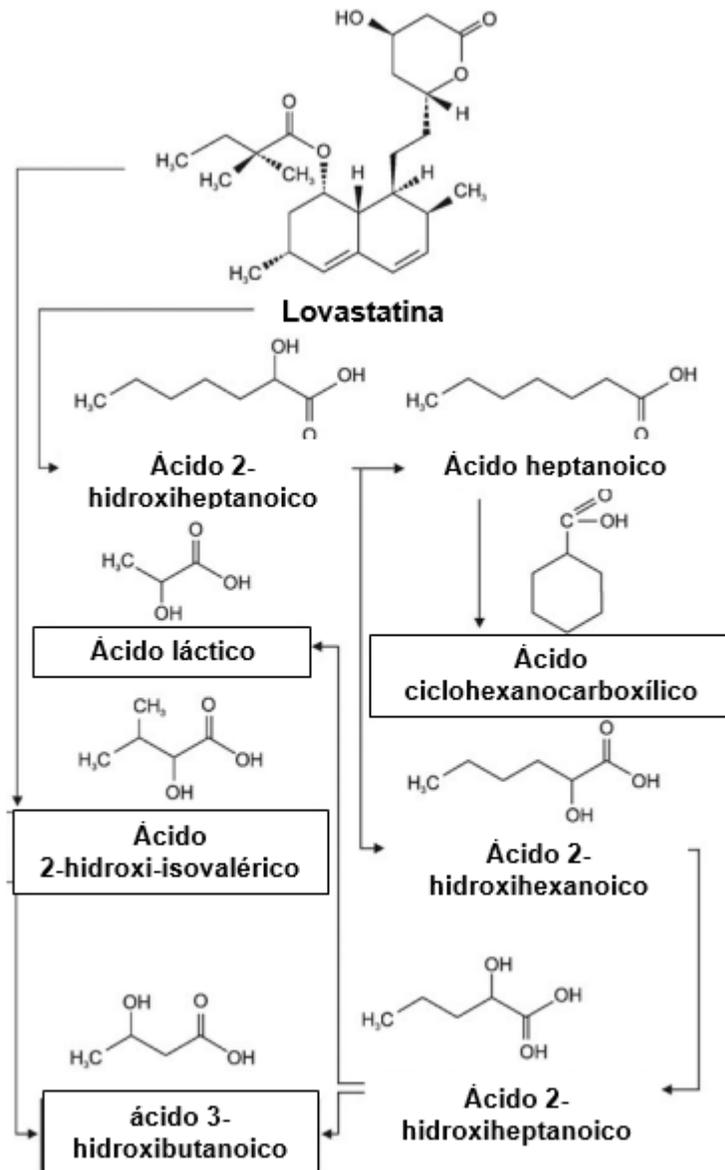


Figura 18. Degradación microbiana y metabolitos derivados de la lovastatina usando un modelo de colon humano a nivel *in vitro* con heces como inóculo (Aura *et al.*, 2011).

Los reportes sobre remoción de Lv en fermentaciones anaerobias, así como de la activación biológica de Lv son escasos (Aura *et al.*, 2010; Demonfort *et al.*, 2017; Beltrán *et al.*, 2019). No obstante, se ha reportado que la incubación de Lv con inóculo fecal de seres humanos tuvo un intervalo de remoción de 73 a 91 % a 6 días de incubación (Beltrán *et al.*, 2019).

Interesantemente, se ha reportado que la microbiota de humanos no convierte la Lv lactona a su forma β hidroxilado, pero cataliza esta última en metabolitos poco identificados. Al respecto, Aura *et al.*, (2011) propusieron la siguiente degradación microbiana (heces de seres humanos) de la lovastatina: (i) desesterificación de la Lv para liberar ácido dimetilbutanoico, (ii) desmetilación del ácido dimetilbutanoico que resulta en la producción de ácido 2-hidroxi isovalérico, (iii) escisión del enlace C-C de la Lv para liberar ácido hidroxil heptanoico, (iv) la ruta alterna para formar ácido 3-hidroxibutanoico puede ser acortada del ácido 2-hidroxihexanoico por oxidación α o β y cambio de la posición del hidroxilo (Figura 18).

7. Conclusión

Actividad 1. Producción de lovastatina en fermentación en estado sólido

La comparación entre las dos cepas de *A. terreus* y los dos sustratos de FES demostró que la cepa CDBB H-194 y rastrojo de avena fue la mejor combinación para producir Lv (23.8 mg/g MS). El tratamiento con la cepa CDBB H-194 y salvado de trigo tuvo concentraciones de Lv muy cercanas a la cepa CDBB H-1976 con ambos sustratos. Las concentraciones de Lv se ajustaron a un modelo de cinética de orden cero para todos tiempos del tratamiento CDBB H-194/rastrojo de avena y para los primeros tiempos de muestreo en los otros tres tratamientos.

Debido a los altos costos de la Lv pura, la FES del rastrojo de avena con la cepa CDBB-H194 podría ser opción competente para producir este compuesto y usarlo para mitigar la producción de metano ruminal.

Actividad 2. Efecto del rastrojo de avena fermentado como portador de lovastatina sobre la producción de metano y fermentación ruminal.

La suplementación de RAF (concentraciones de Lv 100 y 150 mg/L) en una dieta alta en grano demostró potencial anti metanogénico, cabe resaltar que se requiere menos de 20 % de RAF en la dieta para alcanzar hasta 38 % de mitigación de metano ruminal.

Por otra parte, la producción de AGV total en tratamientos RAF (Lv, 100 y 150 mg/L) decreció, pero indujeron un incremento significativo en la proporción molar de propionato respecto al control.

Actividad 3. Inhibición in vitro de la metanogénesis ruminal de una dieta alta en grano con lovastatina

La Lv pura demostró efectos alentadores sobre la mitigación de metano en la fermentación ruminal (43.56 %), sin afectar la producción total y perfil de AGV. No obstante, la dosis para obtener este resultado fue muy alta en comparación con los otros tratamientos. Con respecto al BES y la MON, esta última fue la dosis más efectiva (53.54 %) considerando la relación concentración/inhibición de metano ruminal. El BES tuvo la más alta inhibición de metano (61.66 %) sin presentar muchos cambios en los metabolitos de fermentación ruminal.

Actividad 4 y 5. Caracterización de comunidades microbianas del rumen

El tratamiento RAF (Lv, 150 mg/L) no tuvo efectos significativos sobre los índices de alfa y beta diversidad. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de algunos microorganismos, como un incremento del género *Ruminococcus* y una disminución del género *Prevotella* ambas asociadas al tratamiento RAF.

Las arqueas metanogénicas predominantes 99%+ en las muestras inóculo, control, y tratamiento RAV pertenecieron al género *Methanobrevibacter* y a un grupo minoritario del género *Methanobacterium*, ambos pertenecen al filo *Euryarchaeota*.

Los datos obtenidos demuestran que la reducción de la abundancia relativa del filo *Euryarchaeota* (39.17 %) fue muy cercano a la mitigación de la producción de CH₄ (38 %).

Actividad 6. Inhibición in vitro de metano en bovinos productores de leche

La Lv demostró menor un efecto anti metanogénico con inóculo y una dieta para bovinos productores de leche en comparación con la dieta e inóculo de bovinos productores de carne. La concentración de AGV no fue afectada significativamente, pero indujo cambios en el perfil de AGV, la proporción de acetato disminuyó y aumentó la de propionato.

La remoción de Lv (72 %) indicó que, en condiciones de cultivo (inóculo ruminal y una dieta para bovinos productores de leche) la remoción de este compuesto en incubaciones a corto plazo es alta comparada con la celulosa como sustrato de fermentación ruminal.

8. Referencias

- Ábrego-García A., Poggi-Varaldo H.M., Mendoza-Vargas A., Mercado-Valle F.G., Ríos-Leal E., Ponce-Noyola T., Calva-Calva G. (2021) Effects of fermented oat straw as a lovastatin-carrier on in vitro methane production and rumen microbiota. *Front. Energy Res.* 630701. doi:10.3389/fenrg.2021.630701
- Ali H.K.Q, Zulkali M.M.D. (2011) Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: A review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25(2): 255–266
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC. (2002) *Official Methods of Analysis*, 17th ed Arlington, Vi, USA.
- Aura A.M., Mattila I., Hyötyläinen T., Gopalacharyulu P., Bounsaythip C., Orešič M., Oksman-Caldentey K.M. (2011) Drug metabolome of the simvastatin formed by human intestinal microbiota *in vitro*. *Mol Biosyst.* 7(2):437-46. doi: 10.1039/c0mb00023j
- Azlan, M.P., Jahromi, M.F., Ariff, M.O., Ebrahimi, M., Candyrine, S.C.L., Liang, J.B. (2018) *Aspergillus terreus* treated rice straw suppresses methane production and enhances feed digestibility in goats. *Trop. Anim. Health and Prod.* 50(3): 565-571. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1470-x>
- Bagheri V. M., Klevenhusen F., Zebeli Q., Petri R. (2018) *Scrophularia striata* extract supports rumen fermentation and improves microbial diversity *in vitro* compared to monensin. *Front. Microbiol.* 9, 2164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02164>
- Bansal, S., Goel, G. (2015) Chapter 19. Commercial application of rumen microbial enzymes, In: Puniya, A.K., Singh, R., Kamrapp, D.N., Editores. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer New Delhi, India, pp 281-292.
- Bashir T., Asgher M., Hussain F., Bhatti H.N. (2020) Optimization of process variables for hyper-production of lovastatin from wild type *Aspergillus terreus* and its efficacy studies. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 19(2), 929-939. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio782>
- Beauchemin K.A., Ungerfeld E.M., Eckard R.J., Wang M. (2020) Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* 14(S1), S2–S16. doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Beltrán D., Frutos-Lisón M.D., Espín J. C., García-Villalba R. (2019) Re-examining the role of the gut microbiota in the conversion of the lipid-lowering statin monacolin K (lovastatin) into its active β -hydroxy acid metabolite. *Food Funct.* 10, 1787–1791. <https://doi.org/10.1039/C8FO02594K>
- Bharathi M., Chellapandi P. (2017) Intergenomic evolution and metabolic cross-talk between rumen and thermophilic autotrophic methanogenic archaea. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 107 293-304. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.11.008>
- Bhargavi S.D., Praveen V.K., Kumar, M.A., Savitha J. (2017) Comparative study on whole genome sequences of *Aspergillus terreus* (soil fungus) and *Diaporthe ampelina* (endophytic fungus) with reference to lovastatin production. *Current Microbiology.* 75(1): 84-91. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1353-4>
- Bhargavi S.D., Praveen V.K., Savitha J. (2014) Bioinformatic comparative analysis of lovastatin gene cluster in endophytic fungi and a soil fungus, *Aspergillus terreus*. *MOJ Proteomics and Bioinformatics* 1(4): 114-117. <https://doi.org/10.15406/mojpb.2014.01.00026>
- Bizukojc M., Gonciarz, J. (2015) Influence of oxygen on lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 quantitatively studied on the level of individual pellets. *Bioprocess Biosyst Eng.* 38 (7), 1251-1266. DOI: 10.1007/s00449-015-1366-y
- Borrel G., Adam P.S., Gribaldo S. (2016) Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway: An ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biology and Evolution* 8(6),1706–1711. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw114>
- Brewer A., Williamson M. (1994) A new relationship for rarefaction. *Biodiversity and Conservation* 3(4), 373–379. <https://doi.org/10.1007/BF00056509>
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P.W., 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): 2508-2516. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(05)72928-3

- Candyrine S.C.L., Mahadzir M.F., Garba S., Jahromi M.F., Ebrahimi M., Goh Y.M. (2018) Effects of naturally-produced lovastatin on feed digestibility, rumen fermentation, microbiota and methane emissions in goats over a 12-week treatment period. *PLoS ONE* 13(7), 1–19. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199840>
- Capelari M., Powers W. (2017) The effect of nitrate and monensin on *in vitro* ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 95(11), 5112–5123. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1657>
- Castellan G. (1987) *Físicoquímica*. 2da edición. Pearson, Massachusetts, EUA, pp 1088.
- Chang J., Peng S., Ciaias P., Sauniois M., Dangal S.R.S., Herrero M., Havlik P., Tian H., Bousquet P. (2019) Revisiting enteric methane emissions from domestic ruminants and their $\delta^{13}\text{CCH}_4$ source signature. *Nature Communications*. 10(1): 3420. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11066-3>
- Cottyn B.G., Boucque C.V. (1968) Rapid method for the determination of steam-volatile fatty acids in rumen liquor. *J. Agric. Food Chem.* 16(1):105–107. <https://doi.org/10.1021/jf60155a002>
- Dangal S. R. S., Tian H., Zhang B., Pan S., Lu C., Yang J. (2017) Methane emission from global livestock sector during 1890–2014: Magnitude, trends and spatiotemporal patterns. *Global Change Biology*. 23(10):4147–4161. <https://doi.org/10.1111/gcb.13709>
- Danielsson R., Dicksved J., Sun L., Gonda H., Müller B., Schnürer A., Bertilsson J. (2017) Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Frontiers in Microbiology* 8:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>.
- Demonfort N. V., Armstrong N., Drancourt M. (2017) *In vitro* susceptibility of cultured human methanogens to lovastatin. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 49(2): 176–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.026>
- Deppenmeier U., Müller V. (2008) Life Close to the Thermodynamic Limit: How Methanogenic Archaea Conserve Energy. In: Schäfer G., Penefsky H.S. Editores. *Bioenergetics. Results and Problems in Cell Differentiation*, vol 45. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/400_2006_026
- Dodd D., Mackie R. I., Cann I. K. O. (2010). Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human microbial Bacteroidetes. *Molecular Microbiology*. 79(2): 292–304. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07473.x
- Emerson E.L., Weimer P.J. (2017) Fermentation of model hemicelluloses by *Prevotella* strains and *Butyrivibrio fibrisolvens* in pure culture and in ruminal enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(10): 4269–4278. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8150-7>
- Facchini F. D. A., Vici A. C., Reis V. R. A., Jorge J. A., Terenzi H. F., Reis R. A., Polizeli, M. L. T. (2010) Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 34(3): 347–355. doi:10.1007/s00449-010-0477-8
- Ferry J.G. (2010) How to make a living by exhaling methane. *Annu Rev Microbiol.* 64:453-73. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134051
- Ferry J.G. (2011) Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(3): 351–357. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.011
- Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A., Tempio, G. (2013) Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, pp 189.
- Gezan S.A., Carvalho M. (2018) Chapter 10: Analysis of repeated measures for the biological and agricultural sciences. In B. Glaz and K. M. Yeater (Eds.), *Applied statistics in agricultural, biological, and environmental sciences* (pp 279–298). Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America Inc.
- Godoy M.G., Amorim G.M., Barreto M.S., Freire D.M.G. (2018) Chapter 10: Agricultural residues as animal feed: Protein enrichment and detoxification using solid-state fermentation. In: Pandey A, Larroche C, Socol C, Editores. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation* (pp 235–256). Elsevier Inc.: New York, YN, USA.
- Gómez L. M., Posada S. L, Olivera M. (2016). Starch in ruminant diets: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(2), 77-90. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v29n2a01>
- Goswami S., Vidyarthi A.S., Bhunia B., Mandal T. (2012) A review on lovastatin and its production. *J Biochem Tech.* 4 (1): 581-587.

- Gottlieb K., Wachter V., Sliman J., Pimentel M. (2016) Review article: Inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43(2): 197–212. <https://doi.org/10.1111/apt.13469>
- Greening *et al.* (2019) Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *The ISME Journal*. doi:10.1038/s41396-019-0464-2
- Gulyamova T.G., Ruzieva D.M., Nasmetova S.M., Sattarova R.S., Lobanova K.V, Abdulmyanova L.A., Rasulova G.A. (2018) Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 5(3):19.
- Guyader J., Tavendale M., Martin C., Muetzel S. (2016) Dose-response effect of nitrate on hydrogen distribution between rumen fermentation end products: An *in vitro* approach. *Animal Production Science*. 56(3): 224–230. <https://doi.org/10.1071/AN15526>
- Harlow B. E., Flythe, M. D., Aiken, G. E. (2017). Effect of biochanin A on corn grain (*Zea mays*) fermentation by bovine rumen amyolytic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 870–880. doi:10.1111/jam.13397
- Havlík P., Valin H., Herrero M., Obersteiner M., Schmid E., Rufino M.C. (2014) Climate change mitigation through livestock system transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(10), 3709–3714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308044111>
- Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Janssen P.H. (2015) Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*. 5, 14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>
- Herrero M., Henderson B., Havlík P., Thornton P.K., Conant R.T., Smith P., Stehfest E. (2016) Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*. 6(5): 452–461. <https://doi.org/10.1038/nclimate2925>
- Hill T.C.J., Walsh K.A., Harris J.A., Moffett B.F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 43(1): 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00449-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00449-X)
- Hubert S., Chadwick A., Wachter V., Coughlin O., Kokai-Kun J., Bristol A. (2018) Development of a modified-release formulation of lovastatin targeted to intestinal methanogens implicated in irritable bowel syndrome with constipation. *J. Pharmaceut. Sci.* 107 (2): 662-671.
- Hutchinson C.R., Kennedy J., Park C., Kendrew S., Auclair K., Vederas J. (2000) Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 78(3/4): 287–295.
- Hyde K.D., Xu J., Rapior S., Jeewon R., Lumyong S. (2019) The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97(1):1–136. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, L.A. Meyer, editores], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA., pp 863.
- Jahromi M.F, Liang J.B., Mohamad R., Goh Y.M., Shokryazdan P., Ho Y.W. (2013) Lovastatin-enriched rice straw enhances biomass quality and suppresses ruminal methanogenesis. *Biomed. Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/397934>
- Jahromi M.F., Liang J.B., Ho Y.W., Mohamad R., Goh Y.M., Shokryazdan P., Chin J. (2013b) Lovastatin in *Aspergillus terreus*: fermented rice straw extracts interferes with methane production and gene expression in *Methanobrevibacter smithii*. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 604721. <https://doi.org/10.1155/2013/604721>
- Jain S., Caforio A., Driessen A.J. (2014) Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in Microbiology*. 5, 641. DOI:10.3389/fmicb.2014.00641
- Jaivel N., Marimuthu P. (2010) Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2(7):2730–2733.
- Jirasatid S., Nopharatana M., Kitsubun P., Vichitsoonthonkul T., Tongta A. (2013) Statistical optimization for monacolin k and yellow pigment production and citrinin reduction by *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(3): 364-74. <https://doi.org/10.4014/jmb.1206.06068>

- Joch M., Vadroňová M., Výborná A., Jochová K. (2016). Inhibition of *in vitro* rumen methane production by three statins. *Ann Anim Sci.* 2021. doi:10.2478/aoas-2021-002
- Johnson K.A., Johnson D.E. (1995) Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73(8): 2483–2492.
- Kajdič S., Zupančič S., Rožkar R., Kocbek P. (2019). The potential of nanofibers to increase solubility and dissolution rate of the poorly soluble and chemically unstable drug lovastatin. *International Journal of Pharmaceutics.* 5;573:118809. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118809>
- Kaoutari A. E., Armougom F., Gordon J. I., Raoult D., Henrissat B. (2013) The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology.* 11(7): 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
- Khonkhaeng B., Cherdthong A. (2020) Improving nutritive value of purple field corn residue and rice straw by culturing with white-rot fungi. *Journal of fungi.* 6(2):69. <https://doi.org/10.3390/jof6020069>
- Kim S., Dale B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy.* 26(4):361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
- Klevenhusen F., Duval S., Zeitz J.O., Kreuzer M., Soliva C.R. (2011) Diallyl disulphide and lovastatin: Effects on energy and protein utilisation in, as well as methane emission from, sheep. *Archives of Animal Nutrition.* 65(4):255–266. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2011.588845>
- Klingelhöfer I., Morlock G.E. (2019) Lovastatin in lactone and hydroxy acid forms and citrinin in red yeast rice powders analyzed by HPTLC-UV/FLD. *Anal. Bioanal. Chem.* 411(25):6655–6665. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02039-y>
- Knappy C.S., Nunn C.E.M., Morgan H.W., Keel B. J. (2011) The major lipid cores of the archaeon *Ignisphaera aggregans*: implications for the phylogeny and biosynthesis of glycerol monoalkyl glycerol tetraether isoprenoid lipids. *Extremophiles.* 15: 517-528. DOI: 10.1007/s00792-011-0382-3
- Konings W. N., Sonja V.A., Koning S., Driessen A.J.M. (2002) The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81:61-72.
- Konrad Z., Eichler J. (2002) Lipid modification of proteins in Archaea: Attachment of a mevalonic acid-based lipid moiety to the surface-layer glycoprotein of *Haloferax volcanii* follows protein translocation. *Biochemical Journal.* 366(3):959–964. <https://doi.org/10.1042/BJ20020757>
- Krause D.O., Denman S.E., Mackie R.I., Morrison M., Rae A.L., Attwood G.T., McSweeney C.S. (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews.* 27(5):663–693. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X)
- Kumar A.K., Parikh B.S. (2015) Cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus terreus* D34 and enzymatic saccharification of mild-alkali and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass residues. *Bioresources Bioprocess* 2:7. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0038-8>
- Lê S., Josse J., Husson F. (2008) FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software.* 25(1):1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jenvint.2008.06.007>
- Lee S.Y., Yang S.H., Lee W.S., Kim H.S., Shin D.E., Ha J.K. (2009) Effect of 2-bromoethanesulfonic acid on *in vitro* fermentation characteristics and methanogen population. 22(1):42–48. *J. Anim. Sci.* <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80581>
- Leo T.K., Garba S., Abubakar D., Sazili A.Q., Candyrine S.C.L., Jahromi M.F., Goh Y.M., Ronimus S.M.S., Liang J.B. (2020) Naturally produced lovastatin modifies the histology and proteome profile of goat skeletal muscle. *Animals.* 10(72):19. doi:10.3390/ani10010072
- Levenspiel O. (2004) *Ingeniería de las reacciones químicas*, 3a ed. Limusa Wiley, México. Translation to Spanish of *Chemical Reaction Engineering*, 3rd edn., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Liang J. *et al.* (2020). Promising biological conversion of lignocellulosic biomass to renewable energy with rumen microorganisms: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 134, 110335. doi:10.1016/j.rser.2020.110335
- Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D., Schabenberger O. (2006) *SAS for Mixed Models.* SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Liu H., Wang J., Wang A., Chen J. (2011) Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(5):1333–1340. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3066-5>

- Lorenz R.T., Parks L.W. (1990) Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(9):1660–1665. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.9.1660>
- Magurran A.E. (2004) *Measuring biological diversity*. Malden, USA, Blackwell Publishing. pp 256. ISBN 0-632-05633-9.
- Mao S.Y., Zhang R.Y., Wang D.S., Zhu W.Y. (2013) Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe.* 24:12–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.08.003>
- Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal.* 17(1):10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez-Fernandez G., Denman S.E., Yang C., Cheung J., Mitsumori M., McSweeney C.S. (2016) Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle. *Frontiers in Microbiology.* 7:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01122>
- Masters B. A., Palmoski M.J., Flint O.P., Gregg R.E., Wangiverson D., Durham S.K. (1995) *In vitro* myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 131:163–174. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1058>
- Menke K.H., Steingass H. (1988) Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Mi L., Yang B., Hu X., Luo Y., Liu J., Yu Z., Wang J. (2018) Comparative analysis of the microbiota between sheep rumen and rabbit cecum provides new insight into their differential methane production. *Frontiers in Microbiology.* 9:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00575>
- Miller T.L., Wolin M.J. (2001) Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-SCoA reductase inhibitors. *J. Dairy Sci.* 84(6):1445–1448. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70177-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70177-4)
- Morgavi D. P., Martin C., Boudra H. (2013) Fungal secondary metabolites from *Monascus spp.* reduce rumen methane production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Animal Science.* 91(2):848–860. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5665>
- Mouafi F.E., Ibrahim G.S., Abo E.M.M. (2016) Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 14(2):253–259. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.10.006>
- Mulder K.C.L., Mulinari F., Franco O.L., Soares M.S.F., Magalhães B.S., Parachin N.S. (2015) Lovastatin production: from molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnology Advances.* 33(6):648–665.
- Munir N., *et al.* (2018) Enhanced production of lovastatin by filamentous fungi through solid state fermentation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 31(4):1583–1589.
- Muñoz-Páez K.M., Poggi-Varaldo H.M., García-Mena J., Ponce-Noyola M.T., Ramos-Valdivia A.C., Barrera-Cortés J., Robles-González I.V., Ruíz-Ordaz N., Villa-Tanaca N., Rinderknecht-Seijas N. (2014) Cheese whey as substrate of batch hydrogen production: Effect of temperature and addition of buffer. *Waste Manag. Res.* 32(5):434–440. <https://doi.org/10.1177/0734242X14527333>.
- Murray R.M., Bryant A.M., Leng R.A. (1976) Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br J Nutr.* 36:1–14.
- Muskal SM, Sliman J, Kokai-Kun J, Pimentel M, Wachter V, Gottlieb K. (2016) Lovastatin lactone may improve irritable bowel syndrome with constipation (IBS-C) by inhibiting enzymes in the archaeal methanogenesis pathway. *F1000Res.* 28(5):606. doi: 10.12688/f1000research.8406.3
- Myer P.R., Kim M.S., Freetly H.C., Smith T.P.L. (2016) Evaluation of 16S rRNA amplicon sequencing using two next-generation sequencing technologies for phylogenetic analysis of the rumen bacterial community in steers. *Journal of Microbiological Methods.* 127:132–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.004>
- Myhre G., *et al.* (2013) Anthropogenic and natural radiative forcing. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, ed. Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

- Nagadi S., Herrero M., Jessop N.S. (2000). The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. *Animal Feed Science and Technology*. 87: 231-239.
- Nagaraja, T.G. (2016) Microbiology of the rumen. In: Millen, D., De Beni Arrigoni, R. Lauritani Pacheco, editores. *Rumenology*. Cham, Switzerland, Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2
- Neto R.N.M., Gomes E.D., Weba-Soares L., Dias L.R.L., Da Silva L.C.N., De Miranda R.D.M. (2019) Biotechnology production of statins: metabolic aspects and genetic approaches. *Current pharmaceutical biotechnology*. 20(15):1244-1.
- Nisbet E.G., Dlugokencky E.J., Manning M.R., Lowry D., Fisher R.E., France J.L. (2016) Rising atmospheric methane: 2007-2014 growth and isotopic shift. *Global Biogeochemical Cycles*. 30(9):1356–70. <http://dx.doi.org/10.1002/2016GB005406>
- Nyilasi I., Sándor K., Krisztina K., Galgóczy T., Papp M., Pesti K., Nagy C.V. (2014) Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Med. Mycol.* 52(2):140148. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.828160>
- O'Brien M., Navarro-Villa A., Purcell P.J., Boland T., O'Kiely P. (2014) Reducing *in vitro* rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. *Anim. Prod. Sci.* 54(2):141–157. <https://doi.org/10.1071/AN12204>
- Owens F.N., Basalan M. (2016) Microbiology of the rumen. In: Millen, D., De Beni Arrigoni, R. Lauritani Pacheco, editores. *Rumenology*. Cham, Switzerland, Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2
- Pansuriya R.C., Singhal R.S. (2010) Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(1):164–172. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100024>
- Patel M., Kothari C. (2017) Critical review of statins: a bio-analytical perspective for therapeutic drug monitoring. *Trends in Analytical Chemistry*. 86:206–221. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.10.011>
- Patil R. H., Patil M.P., Maheshwari V. L. (2015) Rapid chromatographic determination and structural confirmation of β -hydroxy acid form of lovastatin in the fermentation broth of *Aspergillus terreus* PM03. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 49(6):419–424. doi:10.1007/s11094-015-1298-5
- Patil R.H., Krishnan P., Maheshwari V.L. (2011) Production of lovastatin by wild strains of *Aspergillus terreus*. *Nat. Prod. Commun* 6(2):183-6. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600207>
- Patra A., Park T., Kim M., Yu Z. (2017) Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8(1):1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Poggi-Valardo H.M, Rinderknecht-Seijas N., Caffarel-Mendez S. (2002) Irreversibility in the adsorptive-desorptive behavior of pollutants in soils and sediments: quantitative evaluation with a differential hysteresis coefficient. *Interciencia*, 27(4):191-194.
- Poggi-Valardo *et al.* (2014) Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review. *Waste Management and Research* 32(5):353–365.
- Poggi-Valardo H.M., Rinderknecht-Seijas N. (2003) A differential availability enhancement factor for the evaluation of pollutant availability in soil treatments. *Acta Biotechnol*, 23(2–3):2712–80.
- Praveen V.K., Bhargavi S.D., Savitha J. (2014) Endophytic fungi: a poor candidate for the production of lovastatin. *British Microbiology Research Journal*. 4(12):1511–1520. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/12487>
- Prévot. V., López M., Copinet E., Duchiron F. (2013) Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresource Technology*. 129:690–693. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.135>
- Puniya A.K., Singh R., Kamra D.N. (2015) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. New Delhi: Springer India.
- Ramírez-Restrepo C.A., O'neill C.J., López-Villalobos N., Padmanabha J., Mcsweeney C. (2014) Tropical cattle methane emissions: The role of natural statins supplementation. *Animal Production Science*. 54(9):1294–1299. <https://doi.org/10.1071/AN14246>

- Ranga N., Appuhamy J.A.D., Strathe A.B., Jayasundara S., Wagner-Riddle C., Dijkstra J., France J., Kebreab E. (2013) Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96(8):5161–5173. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5923>
- Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C., Ghalith G.A.A., Alexander H. (2018) QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ PrePrints*; DOI: <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295>
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584; DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.2584> (accessed June 2019).
- Rollini M., Manzoni M. (2006) Influence of medium design on lovastatin and mevastatin production by *Aspergillus terreus* strains. *Annals of Microbiology* 56 (1):47–51. <https://doi.org/10.1007/BF03174969>
- Ruiz O., Castillo Y., Arzola C., Burrola E., Salinas J., Corral A., Hume M.E., Murillo M., Itza M. (2016) Effects of *Candida norvegensis* live cells on *in vitro* oat straw rumen fermentation. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 29(2):211–218; doi: 10.5713/ajas.15.0166
- Russell J.B. (1987) A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. *J. Anim. Sci.* 64(5):1519–1525. <https://doi.org/10.2527/jas1987.6451519x>
- Rustamova N., Bozorov K., Efferth T. y Yili A. (2020) Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. *Phytochem Rev.* 19, 425–448. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09672-x>
- SAS Institute Inc. (2018) SAS® Studio 3.8: Administrator's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Saunois M. (2020) The Global Methane Budget 2000–2017. *Earth Syst. Sci. Data.* 12:1561–1623, <https://doi.org/10.5194/essd-12-1561-2020>
- Sharma A., Chaudhary P.P., Sirohi S.K., Saxena J. (2011) Structure modeling and inhibitor prediction of NADP⁺ oxidoreductase enzyme from *Methanobrevibacter smithii*. *Bioinformation.* 6(1):15-19. <https://doi.org/10.6026/97320630006015>
- Shen J., Liu Z., Yu Z., Zhu W. (2017) Monensin and nisin affect rumen fermentation and microbiota differently *in vitro*. *Frontiers in Microbiology* 8:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01111>
- Shrivastava B., Kavish K.J., Anup K., Kuhad R.C. (2014) Bioprocessing of wheat straw into nutritionally rich and digested cattle feed. *Scientific Reports* 4:1. <https://doi.org/10.1038/srep06360>
- Soliva C.R., Amelchanka S.L., Duval S.M., Kreuzer M. (2011) Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *Br J. Nutr.* 106:114–122. <https://doi.org/10.1017/S0007114510005684>
- Song J., Luo J., Ma Z., Sun Q., Wu C., Li X. (2019) Quality and authenticity control of functional red yeast rice—a review. *Molecules.* 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101944>
- Sparling R., Risbey D., Poggi-Varaldo H.M. (1997) Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. *Int. J. Hydrogen Energy* 22:563-566. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(96\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(96)00137-1)
- Steel R.G.D., Torrie J.H., Dicky D.A. (1997) Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. 3rd Edition, McGraw Hill, New York, USA, pp 666.
- Subhan M., Faryal R., Macreadie I. (2016) Exploitation of *Aspergillus terreus* for the Production of Natural Statins. *Journal of Fungi* 2(2):13. <https://doi.org/10.3390/jof2020013>
- Sûstar V., Zelko J., Lopalco P., Lobasso S., Ota A., Ulrih N.P. Corcelli A., Kraljiglic V. (2012) Morphology, Biophysical Properties and Protein Mediated Fusion of Archaeosomes. *PLoS ONE.* 7 (7):1–15. DOI: 10.1371/journal.pone.0039401
- Suzuki N., Imai A. (2010) HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin upregulates plasminogen activator production through RhoA-signaling in peritoneal cell line Met5A. *Gynecol Surg.* 7:189–193. DOI: 10.1007/s10397-009-0546-7
- Syed M.B., Ponnusamy T. (2018) Bioconversion of mevastatin to pravastatin by various microorganisms and its applications—a review. *Biocatal Agric Biotechnol.* 13:7462–3. doi:10.1016/j.cbab.2017.11.002
- Syed M.N., Rajendran A., Seraman S., Thangavelu V. (2014) Valorization of agricultural residues for compactin production by *Aspergillus terreus* MTCC 279 in mixed substrate solid state fermentation. *Waste Biomass Valor.* 5:715–724. <https://DOI 10.1007/s12649-013-9276-1>

- Tao S., Tian P., Luo Y., Tian J., Hua C., Geng Y., Cong R., Ni Y., Zhao R. (2017) Microbiome-metabolome responses to a high-grain diet associated with the hind-gut health of goats. *Frontiers in Microbiology*. 8:1–1. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01764>
- Tapio I., Snelling T.J., Strozzi F., Wallace R. J. (2017) The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8:7. DOI: 10.1186/s40104-017-0141-0
- Ungerfeld E. M. (2015) Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: A meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*. 6:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00037>
- Ungerfeld E. M. (2018) Inhibition of rumen methanogenesis and ruminant productivity: A meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*. 5:1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00113>
- Ungerfeld E.M. (2020) Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Front. Microbiol.* 11:589. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- Ungerfeld E.M., Rust S.R., Boone D.R., Liu Y. (2004) Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *J. Appl. Microbiol.* 97(3):520–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02330.x>
- Van Houtert M.F.J. (1993) The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 43(3-4):189–225. doi:10.1016/0377-8401(93)90078-x
- Van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. (2015) Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnology Advances* 33(1):191–202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* 74: 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Walsh T.J., *et al.* (2003) Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J. Infect. Dis.* 188(2):305–319. <https://doi.org/10.1086/377210>
- Wang L.Z., Zhou M. L., Wang J.W., Wu D., Yan T. (2016) The effect of dietary replacement of ordinary rice with red yeast rice on nutrient utilization, enteric methane emission and rumen archaeal diversity in goats. *PLoS One* 11(7), e0160198; DOI: 10.1371/ journal.pone.0160198
- Weimer P.J. (1998) Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective 1. *Journal of Animal Scienc* 76(12):3114–3122; DOI: <https://doi.org/10.2527/1998.76123114x>
- Weimer P.J., Stevenson D.M., Mertens D.R., Thomas E.E. (2008) Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(1):135–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1528-9>
- Weiss S., Xu Z.Z., Peddada S., Amir A., Bittinger K., Gonzalez A. (2017) Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5(1):1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Wen Q., Cao X., Chen Z., Xiong Z., Liu J., Cheng Z., Zheng Z., Long C., Zheng B., Huang Z. (2020) An overview of *Monascus* fermentation processes for monacolin K production. *Open Chemistry*. 18(1):10–21. <https://doi.org/10.1515/chem-2020-0006>.
- Wong A. (2019) Unknown risk on the farm: does agricultural use of ionophores contribute to the burden of antimicrobial resistance?. *mSphere*. 4(5), e00433-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00433>.
- Wu S., Baldwin R.L., Li W., Li C., Connor E.E., Li R.W. (2012) The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Metagenomics*. 1:1–11. <https://doi.org/10.4303/mg/235571>.
- Xu B.J., Wang Q.J., Jia Q.J., Sung C.K. (2005) Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. *Biotechnol. Bioproc. Engineering*. 10:78–84. <https://doi.org/10.1007/BF02931187>.
- Yang D.J., Hwang L.S. (2006) Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J. Chromatogr. A*. 1119(1-2):277–284. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.031>

- Yáñez-Ruiz *et al.* (2016) Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. *Animal Feed Science and Technology*, 216:1–18. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.03.016
- Ying J, Du LD, Du GH. Lovastatin. In: Du G-H, editor. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer, Singapore. 2018. p. 93-99. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7_15
- Zhang B.B., Lu L.P., Xu G.R. (2015) Why solid-state fermentation is more advantageous over submerged fermentation for converting high concentration of glycerol into Monacolin K by *Monascus purpureus* 9901: A mechanistic study. *Journal of Biotechnology*. 206:60–65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.011>.
- Zheng M., Zuo S., Niu D., Jiang D., Tao Y., Xu C. (2020) Effect of four species of white rot fungi on the chemical composition and *in vitro* rumen degradability of naked oat straw. *Waste and Biomass Valorization*. 12: 435–443. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00991-w>.
- Zhou M., Chen Y., Guan L.L. (2015) Rumen bacteria. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, ed. Puniya, A. K., Singh, R., Kamra, D. N. pp 79-98. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_6.
- Zhou R., Wu J., Lang X., Liu L., Casper D.P., Wang C., Zhang L., 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):2303–2314. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16611>.
- Zhu H., Zeng D., Wang N., Niu L., Zhou Y., Zeng Y., Ni X. (2018) Microbial community and diversity in the feces of Sichuan takin (*Budorcas taxicolor tibetana*) as revealed by Illumina Miseq sequencing and quantitative real-time PCR. *AMB Express* 8(1), article 68; DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0599-y>.
- Zicarelli F., Calabrò S., Cutrignelli M.I., Infascelli F., Tudisco R., Bovera F., Piccolo, V. (2011). *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *J. Sci. Food Agric*. 91:1213-1221.

9. Anexos

9.1. Medio de cultivo anaerobio

El medio de cultivo se dividió en: solución buffer, solución mineral, solución de elementos traza, solución de rasazurina, solución reductora, y agua destilada.

1 L de medio de cultivo:

1. 237 mL de solución buffer: NaHCO_3 , 35; NH_4HCO_3 , 4 (g/L).
2. 237 mL solución mineral: Na_2HPO_4 , 5.7; KH_2PO_4 , 6.2; $\text{Mg SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6. 0.12 mL (g/L).
3. solución de elementos traza: $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 13.20; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{FeCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.8 (g/L).
4. 1.22 mL solución de rasazurina (100 mg rasazurina aforados en 100 mL de agua destilada)
5. 49.5 mL de solución reductora (se prepara el día que se inocula, 2 mL de NaOH 1N; 285 mg de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 47.5 mL de agua destilada para 1 L).
6. 475 de agua destilada

9.2. Método de extracción de DNA

1. Agregar 1 mL de medio del digestor a un microtubo de 1.5 mL
2. Centrifugar la muestra a 10,000 xg por 30 segundos.
3. Agregar las 6 pastillas a un tubo de perlas de 2 mL y vortexear suavemente.
4. Agregar 60 μL de la solución S1 e invierte varias veces o vortexear brevemente.

Nota: si la solución S1 tiene precipitados calentar a 60 °C para disolver el SDS presente (puede utilizarse estando caliente).

5. Añadir 200 μ L de la solución IRS, solo si el DNA será usado para PCR (para muestras de suelo).
6. Agitar en Vortex a máxima velocidad horizontalmente por 10 minutos
7. Centrifugar los tubos a 10,000 xg por 30 segundos y transfiere el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio (400 a 450 μ L).
8. Agregar 250 μ L de la solución S2 por 5 segundos e incuba a 4 °C por 5 minutos y centrifuga a 10,000 xg por 1 minuto.
9. Transferir todo el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga y agrega 1.3 mL de solución S3 al sobrenadante y vortexear por 5 segundos.
10. Cargar aproximadamente 700 μ L en un filtro y centrifuga a 10,000 xg por 1 minuto. Descartar el centrifugado y añade el sobrenadante restante al filtro y centrifuga a 10,000 xg por 1 minuto. Repite hasta que todo el sobrenadante haya pasado a través del filtro (tres cargas por muestra).
11. Agregar 300 μ L de solución S4 y centrifuga a 10,000 xg por 30 segundos. Descarta el centrifugado del tubo de recolección. Centrifuga nuevamente por 1 minuto.
12. Con cuidado poner el filtro en nuevo tubo limpio evitando salpicar con la solución S4
13. Añadir 50 μ L de la solución S5 al centro de la membrana blanca del filtro y centrifugar por 30 segundos

9.3. Purificación con perlas magnéticas AMPure XP

- 1.- Extraer 25µL producto de PCR y se centrifugan para evitar que queden gotas en las paredes.
- 2.- Se añaden 25µL de perlas AMPure en cada muestra y se homogeniza la muestra en un shaker por 2 min.
- 3.- Se mantiene la mezcla anterior a temperatura ambiente por 5 min.
- 4.- Poner la mezcla anterior en separador magnético por 2 min (observar que se aclara el sobrenadante).
- 5.- Cuidadosamente se retira el sobrenadante sin apartar los tubos del separador magnético.
- 6.- Sin mover los tubos del separador magnético se agrega 1 mL EtOH (80 %), se mantiene por 30 seg. y se remueve el EtOH.
- 7.- Se realiza un segundo lavado con EtOH (80 %) repitiendo el paso 6.
- 8.- Retirar los tubos del separador magnético y añadir 52.5 µL de Tris 10 mM a cada tubo y agita en vortex por 1 minutos, mantener a temperatura ambiente por 2 min.
- 9.- Colocar los tubos en el separador magnético (2 min.) hasta observa que se aclara el sobrenadante.
- 10.- Transferir 50 µL del sobrenadante a un tubo limpio.
- 11.- Cuantificar por fluorímetro (Qubit) la cantidad de DNA.

Cuadro A1. Cuantificación de DNA mediante espectrofotometría de las muestras de fluido ruminal en condiciones *in vitro*

| Muestra | ng/ μ L | 260/280 |
|-----------------|-------------|---------|
| Rumen-3 0H | 91.15 | 1.6825 |
| Rumen-3 0H F | 79.15 | 1.7375 |
| Rumen-1 0H S | 55.1 | 2.004 |
| Rumen-1 0H F | 54.55 | 2.03 |
| Rumen-2 0H S | 73.95 | 2.058 |
| Rumen-2 0H F | 46.5 | 2.4095 |
| T3-2 24H S | 33.1 | 1.288 |
| T3-2 24H F | 27.8 | 1.288 |
| Control-3 24H S | 29.5 | 1.3055 |
| Control-3 24H F | 28.8 | 1.2465 |
| Control-1 48H S | 27.5 | 1.3065 |
| Control-1 48H F | 23 | 1.1755 |
| Control-2 48H S | 34.4 | 2.0855 |
| Control-2 48H F | 34.55 | 1.981 |
| Control-4 48H S | 20.9 | 1.9215 |
| Control-4 48H F | 34.45 | 2.1195 |
| T3-1 48H S | 32.25 | 2.0245 |
| T3-1 48H F | 30.9 | 2.095 |
| T3-3 48H S | 28.1 | 1.239 |
| T3-3 48H F | 28.15 | 1.227 |
| T3-4 48H S | 21.6 | 1.8365 |
| T3-4 4H F | 40.7 | 2.03 |

Cuadro A2. Coeficiente de determinación b1 (pendiente) del modelo cinético de orden cero ajustado a los rendimientos finales de lovastatina.

| Tratamiento | b ₁ ^a mg Lv (g MS/d) | S.D. ^b mg Lv (g MS/d) |
|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>At</i> H-194, salvado de trigo | 0.5733 b | 0.0857 |
| <i>At</i> H-194, rastrojo de avena | 1.4495 a | 0.0869 |
| <i>At</i> H-1976, salvado de trigo | 0.7095 b | 0.0849 |
| <i>At</i> H-1976, rastrojo de avena | 0.3904 b | 0.0548 |

^a Coeficiente de determinación b1 (pendiente) del modelo cinético de cero orden ajustado a los rendimientos finales de Lv; ^b desviación estándar de la pendiente; ^c *Aspergillus terreus*. Medias con diferente letra en columna son estadísticamente diferentes (Tukey; P < 0.05).

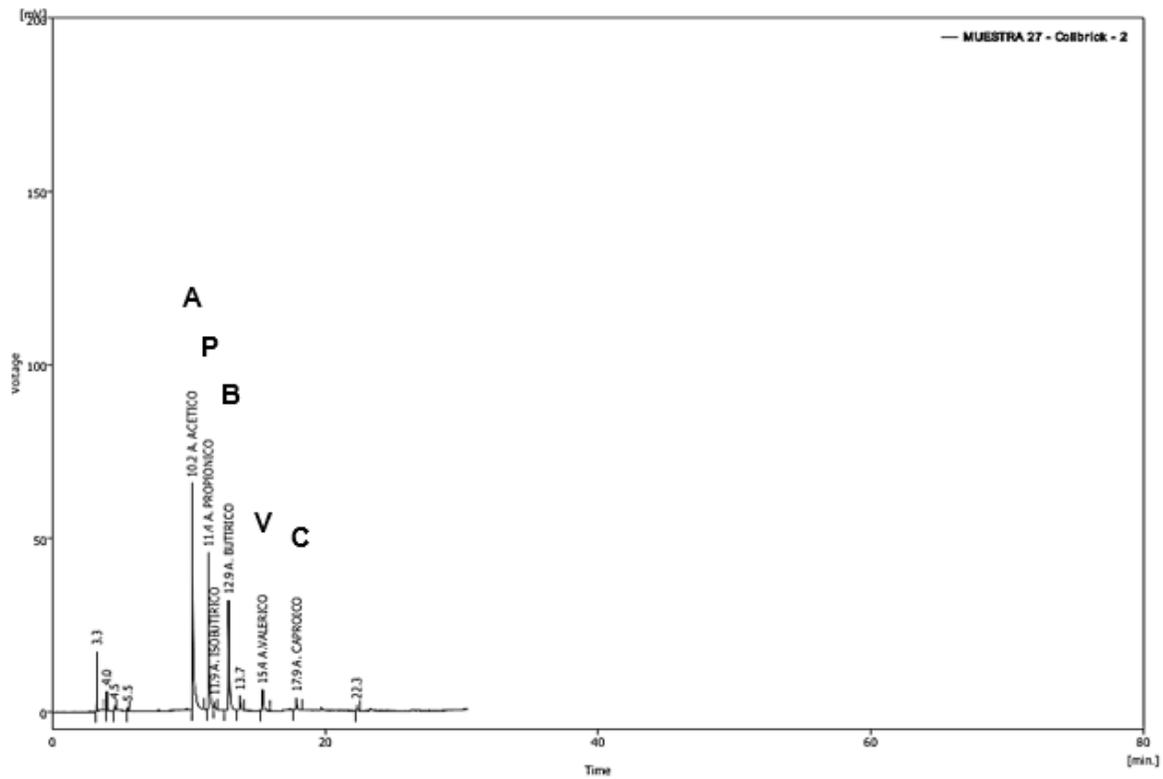


Figura A1. Cromatograma (GC) de los ácidos grasos volátiles derivados de la fermentación ruminal *in vitro*. Los picos representan: A, acético; P, propiónico; B, butírico; V, valérico; C, capríico.

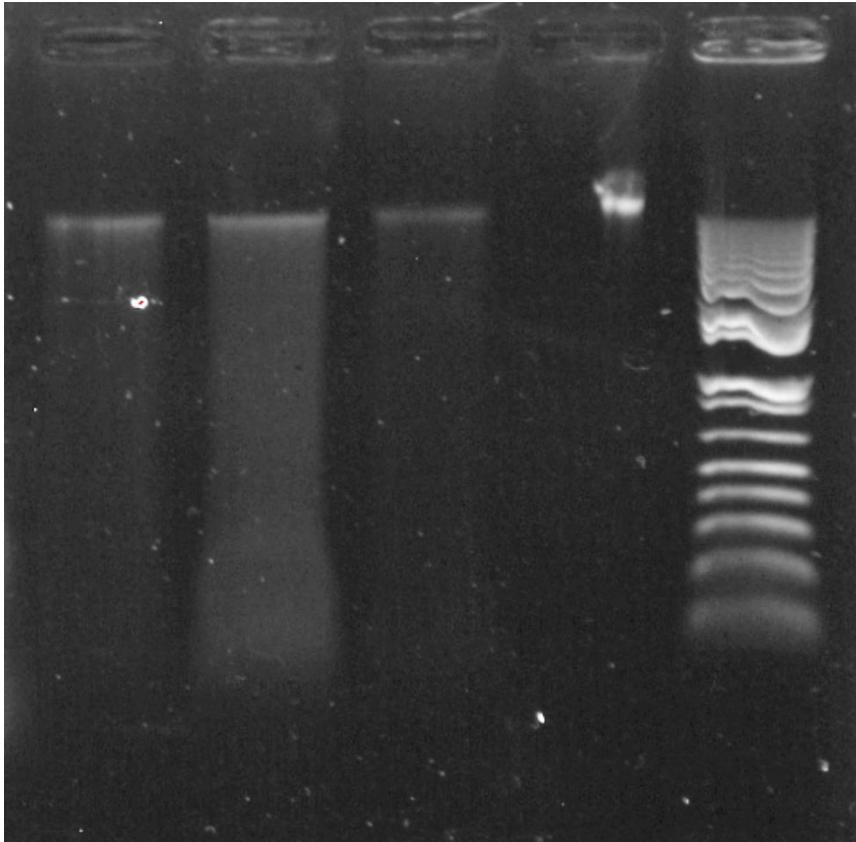


Figura A2. Producto de PCR del DNA genómico (muestras de fluido ruminal), el carril 5 contiene un marcador de peso molecular de 1 Kb plus.

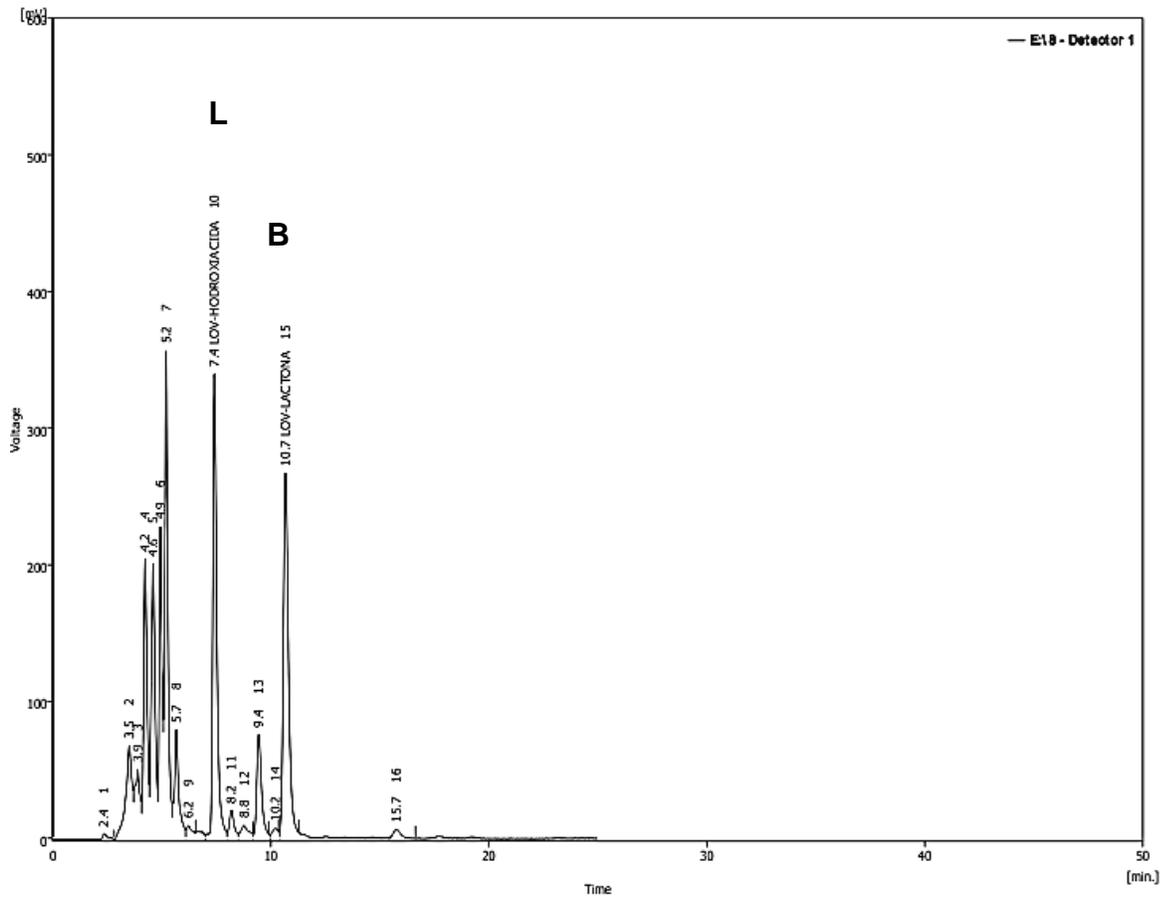


Figura A2. Cromatograma (HPLC) de la lovastatina en forma hidroxiaácido y lactona producida en FES. Los picos representan Lv: L en forma lactona y B, en forma β -hidroxiaácido.

9.4. Publicaciones derivadas de la presente tesis

Revistas indexadas (JCR)

- Ábrego-García A., Poggi-Varaldo H.M., Mendoza-Vargas A., Mercado-Valle F.G., Ríos-Leal E., Ponce-Noyola T. y Calva-Calva G. (2021). Effects of fermented oat straw as a lovastatin-carrier on *in vitro* methane production and rumen microbiota. *Frontiers Energy Research*. 9. 630701.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.630701>
- Ábrego-Gacía A., Poggi-Varaldo H. M., Robles-González V., Ponce-Noyola Ma. T., Calva-Calva G., Estrada-Bárceñas D., Mendoza-Vargas A. (2021). Lovastatin as a supplement to mitigate rumen methanogenesis: an overview. *Journal Animal Science and Biotechnology*. Aceptado.
- Ábrego-García A, Poggi-Varaldo H.M., Robles-González V., Ríos-Leal E., Ponce-Noyola T., Calva-Calva G., Estrada-Bárceñas D., Mendoza-Vargas A. (2021). Inhibición *in vitro* de la metanogénesis ruminal de una dieta alta en grano con lovastatina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. En arbitraje.

Publicaciones en Congresos Nacionales e Internacionales

- Ábrego G.A., Poggi V.H.M., Robles G.V., Ríos L.E., Ponce N.T., Calva C. G., Mendoza V.A., Estrada B.D. (2020). Mitigación *in vitro* de metano ruminal con lovastatina, monensina sódica y ácido bromoetano sulfónico. Simposio Ambiental y Bioenergía 2020. CINVESTAV. Ciudad de México, México. 17 y 18 de septiembre de 2020. **Premiada como la mejor presentación de la temática** “Cambio Climático e Impactos ambientales”.
- Ábrego G.A., Poggi V.H.M., Robles G.V., Ríos L.E., Ponce N.T., Calva C. G., Estrada B.D., Tapia R.J. (2020). Efecto de la lovastatina sobre la producción de metano ruminal: una revisión. Simposio Ambiental y Bioenergía 2020. CINVESTAV. Ciudad de México, México. 17 y 18 de septiembre de 2020.
- López R. N., Abrego G. A., Poggi V.H.M., Méndez-Hernández, J. E. (2020). Genómica de la inhibición de metano con lovastatina en arqueas metanogénicas. Simposio Ambiental y Bioenergía 2020. CINVESTAV. Ciudad de México, México. 17 y 18 de septiembre.
- Ábrego-Gacía A, Poggi-Varaldo H. M., Ponce-Noyola M. T., Calva-Calva G., Ríos-Leal E., Estrada-Bárceñas D, Mendoza-Vargas A. (2018). Production of lovastatin using agricultural residues as substrates. The Sixth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. Ciudad Obregón, Sonora, México. Nov. 5 – 9.
- Ábrego-Gacía A., Poggi-Varaldo H. M., Mercado-Valle F. G., Robles-González V., Hernández-Mendo O, Tapia-Ramírez J. (2018). Effect of lovastatin on ruminal methanogenesis: a review. The Sixth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. Ciudad Obregón, Sonora, México. Nov. 5 – 9.