

EL USO DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS DE LA METANOGENÉISIS EN RUMIANTES

THE USE OF ENZYMATIC INHIBITORS OF METHANOGENESIS IN RUMINANTS

Romero-Pérez, A.^{1*}; Beauchemin, K.A.²

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, 04510, México. ²Lethbridge Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, AB T1J 4B1, Canada.

*Autor de correspondencia: atmir@ualberta.ca

RESUMEN

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad. Existen diversos inhibidores que han sido ampliamente estudiados y que han demostrado su efectividad para reducir la producción de metano (CH₄) entérico en rumiantes. Sin embargo, su uso comercial se ha visto limitado ya que pueden presentar desventajas como: adaptación microbiana, ser tóxicos o dañinos para el medio ambiente. El reciente desarrollo de compuestos sintéticos con elevado potencial para inhibir la producción de CH₄ y que han probado su efectividad en el largo plazo ha incrementado el interés de los investigadores en esta área del conocimiento. En este trabajo se analizan diversos inhibidores de la metanogénesis desde una perspectiva histórica, poniendo especial énfasis en el 3-nitrooxypropanol, el cual ha sido evaluado bajo diversas condiciones experimentales con resultados alentadores.

Palabras clave: Metano, inhibidores, rumiantes, 3-nitrooxypropanol.

ABSTRACT

Enzymatic inhibitors are molecules that bind to enzymes and decrease their activity. There are various inhibitors that have been widely studied and that have proven their effectiveness in reducing the production of enteric methane (CH₄) in ruminants. However, their commercial use has been limited since they can present disadvantages, such as microbial adaptation, being toxic or harmful to the environment. The recent development of synthetic compounds with high potential to inhibit the production of CH₄ and which have proven their effectiveness in the long term has increased the interest of researchers in this area of knowledge. In this study, different inhibitors of methanogenesis are analyzed from a historical perspective, placing special emphasis on 3-nitrooxypropanol, which has been evaluated under diverse experimental conditions with encouraging results.

Keywords: Methane, inhibitors, ruminants, 3-nitrooxypropanol.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los grandes retos que enfrenta la humanidad en este siglo. A nivel mundial la industria ganadera es una fuente importante de gases de efecto invernadero (GEI), ya que contribuye con el 14.5% de las emisiones antropogénicas globales, de las cuales el 44% corresponde a metano (CH₄) el cual proviene principalmente de los procesos de fermentación entérica en los animales rumiantes (Gerber *et al.*, 2013). El CH₄ es producido por los rumiantes durante el proceso normal de digestión y representa una pérdida para el animal de entre el 2 y el 12% de la energía consumida en el alimento (Johnson y Johnson, 1995). Por tanto, reducir la producción de CH₄ es deseable tanto desde el punto de vista ambiental como productivo. Diversas estrategias han sido propuestas y evaluadas como opciones para mitigar la producción de CH₄ en rumiantes (por ejemplo ionóforos, extractos de plantas, mayor inclusión de grano en la dieta, adición de grasa, aceites esenciales, aceptores de electrones, etc.). Algunos aditivos tienen el potencial de reducir las emisiones de CH₄, sin embargo no todos han sido evaluados en experimentos a largo plazo, algunos pueden ser tóxicos o no ser económicamente viables (Hristov *et al.*, 2013). Los inhibidores enzimáticos de la metanogénesis han sido evaluados ampliamente desde los años sesenta con resultados prometedores y el reciente desarrollo de nuevos inhibidores con características mejoradas ha incrementado el interés de los investigadores en este campo de la ciencia.

Inhibidores de la metanogénesis y su clasificación

Los inhibidores enzimáticos se pueden definir como moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad. El uso de inhibidores de la producción de CH₄ entérico en la alimentación animal ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista productivo, a través de la disminución de la producción de CH₄ como un medio para mejorar la eficiencia de la utilización de la energía consumida por los animales. Sin embargo, en los últimos años, su estudio también se ha enfocado en la disminución de las emisiones de CH₄ como fin en sí mismo, dada la importante contribución de este gas a las emisiones globales de GEI (Cuadro 1).

Tipos de inhibidores enzimáticos de la metanogénesis

En base a su estructura química es posible dividir a los inhibidores enzimáticos de la metanogénesis en dos categorías generales: 1) Los análogos de CH₄ como el cloroformo o el bromoclorometano (BCM), y 2) los análogos de la coenzima M (CoM) como el bromoetanosulfonato (BES) y el 3-nitrooxypropanol (NOP). Algunos estudios utilizando compuestos con estructuras más complejas y que no corresponden a estas categorías, como la ciclodextrina, también han sido publicados.

Análogos estructurales del metano

El estudio de los inhibidores enzimáticos de la metanogénesis se originó de forma accidental durante un experimento *in vitro* enfocado en la producción de CH₄ utilizando contenido ruminal de bovinos (Bauchop, 1967). La excesiva producción de espuma durante la fermentación se redujo

Cuadro 1. Inhibidores de metano entérico evaluados en rumiantes.

Inhibidor	Especie	Dosis, g por día ^a	Duración, días	Disminución de CH ₄ , %	Producción animal
BCM	Bovinos carne ⁽¹⁾	5.5	28	100	NA
	Cabras ⁽²⁾	0.13	70	33	NA
	Bovinos carne ⁽³⁾	1.1	90	60	NA
Cloroformo ^b	Bovinos leche ⁽⁴⁾	2.2	42	94-95	NA
BES ^b	Ovinos ⁽⁵⁾	2	7	99	NE
	Ovinos ⁽⁶⁾	0.1	30	25	NA
NOP	Bovinos carne ⁽⁷⁾	2.8	28	33	NA
	Bovinos carne ⁽⁸⁾	2	112	59	NA
	Bovinos carne ⁽⁹⁾	1.2	238	29-81	↑ EA
	Bovinos carne ⁽¹⁰⁾	0.8-2.1	28	16-49	NE
	Bovinos leche ⁽¹¹⁾	2	28	60	↑ GDP
	Bovinos leche ⁽¹²⁾	2.2	84	32	↑ GDP
	Bovinos leche ⁽¹³⁾	2.5	28	37	NA

BCM, bromoclorometano; BES, bromoetanosulfonato; NOP, 3-nitrooxypropanol; NA, no se afectó; NE, no se evaluó; ↑, incremento; EA, eficiencia alimenticia; GDP, ganancia diaria de peso.

⁽¹⁾Johnson *et al.* (1972); ⁽²⁾Abecia *et al.* (2012); ⁽³⁾Tomkins *et al.* (2009); ⁽⁴⁾Knight *et al.* (2011);

⁽⁵⁾Immig *et al.* (1996); ⁽⁶⁾Martínez-Fernández *et al.* (2014); ⁽⁷⁾Romero-Pérez *et al.* (2014); ⁽⁸⁾Romero-Pérez *et al.* (2015); ⁽⁹⁾Vyas *et al.* (2016a); ⁽¹⁰⁾Vyas *et al.* (2016b); ⁽¹¹⁾Haisan *et al.*, 2014; ⁽¹²⁾Hristov *et al.* (2015); ⁽¹³⁾Haisan *et al.* (2017).

^a Dentro de cada experimento solo se presenta la dosis que tuvo un mayor efecto. Las dosis fueron transformadas a g/día en caso de ser necesario.

^b Se observó adaptación microbiana al compuesto.



con un producto antiespumante. El posterior análisis de las muestras de gas mostró que el CH₄ no se encontraba presente en la mezcla de gases. La composición del producto antiespumante era desconocida pero tenía un olor parecido al cloroformo. El olor a cloroformo y la analogía estructural entre el CH₄ y el cloroformo respaldaron la hipótesis de que este compuesto estaba presente en el antiespumante y de que era el responsable de la reducción en la producción de CH₄. Para probar esta hipótesis, se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro* para evaluar los efectos antimetanogénicos del cloroformo y de otros análogos estructurales del CH₄ como el diclorometano y el tetraclorometano (Bauchop, 1967). Todos los compuestos evaluados redujeron la producción de CH₄ en un 86-100% y dicha reducción fue acompañada por la acumulación de gas hidrógeno (H₂). Dado que la mayor parte del CH₄ en el rumen se forma a partir del CO₂ y H₂, una disminución en la producción de CH₄ puede resultar en la acumulación de H₂ en caso de que éste no sea redirigido hacia otros productos de la fermentación que requieran H₂ para ser sintetizados.

El modo de acción de los análogos del CH₄ está basado en la inhibición de las reacciones de transferencia del grupo metilo durante el proceso de metanogénesis que dependen de la vitamina B₁₂ (Tomkins *et al.*, 2009).

Diversos experimentos se han realizado tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar el potencial de mitigación de la producción de CH₄ de diferentes inhibidores enzimáticos. Por ejemplo, Van Nevel *et al.* (1969), reportaron que la producción de CH₄ en ovinos fue completamente inhibida con la infusión de 4 g de hidrato de cloro directamente en el rumen. También observaron un incremento en la concentración de propionato y una reducción en la concentración de acetato en el líquido ruminal. El cambio en los productos de fermentación hacia más propionato es una respuesta comúnmente observada con la utilización de inhibidores en la alimentación de rumiantes, lo cual es deseable desde el punto de vista productivo ya que el propionato es un compuesto gluconeogénico que puede incrementar la energía disponible para la producción de carne y leche. En general, existe una relación inversa entre el CH₄ y el propionato por lo que una disminución en la producción de CH₄ puede causar un aumento en la producción de propionato, ya que la síntesis de propionato representa una vía alterna para el H₂ en el rumen. Por su parte, Trei *et al.* (1971) demostraron que el uso de halometanos

simples como el BCM eran potentes inhibidores de la metanogénesis. Esto fue confirmado en un experimento con novillos consumiendo 5.5 g de BCM (Johnson *et al.*, 1972) en donde la producción de CH₄ se inhibió completamente sin afectar la ganancia diaria de peso (GDP).

Debido a que los halometanos son líquidos volátiles, su utilización como aditivos alimenticios no es viable a nivel de granja; por tanto, algunos investigadores se enfocaron en el desarrollo de nuevos inhibidores de la metanogénesis que tuvieran propiedades físicas más deseables. Sin embargo, dichos inhibidores con propiedades mejoradas resultaron ser poco efectivos para reducir la producción de CH₄ en experimentos con animales (Czerkawski y Breckenridge, 1975).

El estudio de los análogos estructurales del CH₄ como estrategia para reducir las emisiones de CH₄ en rumiantes ha continuado hasta la fecha, siendo el cloroformo y el BCM los inhibidores con mayor potencial de reducción dentro de esta categoría (Knight *et al.*, 2011; Abecia *et al.*, 2012; Tomkins *et al.*, 2009).

A pesar de su potencial para reducir las emisiones de CH₄, la utilización de compuestos como el cloroformo y el BCM presentan diversos inconvenientes. El cloroformo es tóxico (Plaa, 2000), mientras que el BCM es un compuesto cuyo uso ha sido prohibido en diversos países debido a que puede dañar la capa de ozono (Tomkins *et al.*, 2009). Por tanto, los estudios más recientes utilizando estos compuestos se han realizado únicamente con el objetivo de comprender mejor el metabolismo del rumen cuando la metanogénesis es inhibida y para determinar sus posibles efectos en la producción animal pero sin la finalidad de validar su uso como una estrategia para reducir las emisiones de CH₄ a nivel de granja.

Análogos estructurales de la coenzima M

El estudio de los inhibidores de la metanogénesis correspondiente al grupo de análogos de la CoM tuvo su origen en los años 70's, después del descubrimiento de dicha coenzima, la cual participa en la transferencia de grupos metilo en la metanogénesis (McBride y Wolfe, 1971). Las formas metiladas de la CoM y la coenzima B (CoB) son utilizadas como sustrato por la enzima metil-CoM reductasa (MCR) en el último paso de la metanogénesis. Una vez que se reveló la estructura química de la CoM, una serie de experimentos se

llevaron a cabo para evaluar los efectos inhibitorios de diferentes análogos estructurales, en el entendido de que estos compuestos podían competir por el sitio activo reservado para esta coenzima y de esta manera inhibir la síntesis de CH₄. Por ejemplo, cuando el BES se evaluó en ovinos (Immig *et al.*, 1996), la infusión del compuesto a través de la cánula en rumen resultó en una drástica disminución de la concentración de CH₄, (99%); sin embargo, después de 4 días la concentración de CH₄ se recuperó, evidenciando la adaptación de los microorganismos del rumen a este compuesto. En consecuencia, la idea de utilizar el BES para reducir la producción de CH₄ a nivel de granja fue abandonada. El BES ha sido utilizado como modelo para desarrollar nuevos compuestos que tengan características similares pero que puedan disminuir la producción de CH₄ a largo plazo.

El caso del 3-nitrooxypropanol (NOP)

El descubrimiento de la estructura cristalina de la enzima MCR junto con la disponibilidad de técnicas *in silico* y de cribado virtual, han abierto las puertas al desarrollo de nuevos compuestos que pueden competir con la CoM por el sitio activo en la enzima MCR. Las investigaciones en esta área del conocimiento lideradas por DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland) condujeron al reciente desarrollo de la molécula sintética NOP (Duval y Kindermann, 2012). Este inhibidor fue diseñado para no tener carga, permitiendo la penetración en las células por medio de difusión pasiva, y para ser moderadamente oxidante. Estas consideraciones dieron paso a una serie de candidatos potenciales que mejor se acoplaban al sitio activo de la MCR, dentro de los cuales el NOP resultó ser el más prometedor. La enzima MCR tiene un cofactor (F₄₃₀) que posee un ion níquel el cual se puede encontrar en diferentes estados de oxidación (I, II y III) pero tiene que estar en su forma Ni(I) para ser activo (Thauer, 1998). La estructura molecular del NOP es similar a la de la metil-CoM. Esta característica, junto con su potencial moderado de oxidación permiten que el NOP se acople al sitio activo de la enzima MCR donde favorece la oxidación del ion níquel el cual pasa de su forma activa Ni(I) a su forma inactiva Ni(II), inhibiendo así el proceso de metanogénesis (Duin *et al.*, 2016).

Martínez-Fernández *et al.* (2014) fueron los encargados de realizar las primeras evaluaciones del NOP en rumiantes. Al ser evaluado *in vitro*, el NOP (66 μ M) redujo la producción de CH₄ hasta en un 95%. Posteriormente, en un experimento con ovinos recibiendo 0.1 g por

animal por día de NOP se observó una disminución de las emisiones de CH₄ del 30% sin efectos negativos en el consumo de alimento o GDP. Tomando como base la experiencia exitosa en ovinos, se planearon nuevos estudios en Canadá, Reino Unido y más recientemente Estados Unidos para verificar la eficacia del NOP tanto en ganado bovino productor de carne como de leche.

En un estudio realizado en la Universidad de Alberta (Haisan *et al.*, 2014), se evaluó el uso del NOP (2.5 g por animal por día) en bovinos productores de leche consumiendo una dieta con 38% de forraje. En este estudio la producción de CH₄ disminuyó en un 60% sin observarse efectos negativos sobre el consumo de alimento, la producción de leche o la composición de la misma. Adicionalmente, las vacas consumiendo NOP incrementaron su GDP, indicando que la reducción de la producción de CH₄ incrementó la energía disponible para los animales. En un estudio posterior (Haisan *et al.*, 2017), la adición de 1.25 y 2.5 g por animal por día de NOP a la dieta de vacas lactantes (60% de forraje) redujo las emisiones de CH₄ en un 23 y 37% respectivamente sin comprometer la producción de leche. La diferencia entre estos dos experimentos en cuanto a la magnitud de la disminución de las emisiones de CH₄ fue atribuida al tipo de dieta consumida, ya que dietas con menor contenido de forraje están asociadas a una menor producción de CH₄.

Por otra parte, en un estudio realizado por Romero-Pérez *et al.* (2015) con bovinos productores de carne consumiendo hasta 2.7 g por animal por día de NOP, las emisiones de CH₄ disminuyeron hasta en un 33% sin afectar negativamente la digestibilidad. Al igual que otros inhibidores de la metanogénesis, el uso de NOP generó un incremento en la concentración de propionato en el rumen. La inhibición en la producción de CH₄ fue confirmada en un experimento a largo plazo de 112 días (Romero-Pérez *et al.*, 2015). Por su parte, Vyas *et al.* (2016a) en una prueba de comportamiento observaron que la adición de NOP redujo la producción de CH₄ hasta en 29% cuando bovinos de engorda fueron alimentados con una dieta a base de forraje (35% de forraje) y hasta en 81% cuando la dieta fue a base de grano (92% de grano). Dicha disminución de CH₄ estuvo acompañada de una mayor eficiencia alimenticia cuando se utilizó la dieta a base de forraje; sin embargo, la reducción sustancial en las emisiones de CH₄ con la dieta a base de grano no mejoró el comportamiento productivo de los animales. Aparentemente, una disminución



moderada de las emisiones de CH₄ (aproximadamente 30%) parece estar asociada con un mejor rendimiento y eficiencia energética, posiblemente porque los cambios en el ecosistema ruminal no son drásticos (Vyas *et al.*, 2016a).

Hristov *et al.* (2015) realizaron un estudio a largo plazo utilizando vacas en lactancia donde la producción de CH₄ se redujo hasta en un 30% cuando el NOP (40, 60 y 80 mg NOP kg⁻¹ alimento en base seca) se administró por un periodo de 12 semanas. La producción de CH₄ se mantuvo inhibida a lo largo del experimento lo cual indicó que no hubo adaptación al compuesto por parte de los microorganismos del rumen. Al igual que Haisan *et al.* (2014), Hristov *et al.* (2015) reportaron un incremento promedio en la GDP (80%) sin efectos negativos en la producción de leche. A decir de los autores de estos estudios, la razón por la cual la GDP se vio favorecida sobre la producción de leche se puede deber a que los animales se encontraban en una etapa media de la lactancia, en la cual la producción de leche ya no es una prioridad energética. Los experimentos con bovinos de leche son los que más claramente demuestran como la disminución de la pérdida de energía del alimento en forma de CH₄ puede dar como resultado una mayor disponibilidad de energía para fines productivos.

CONCLUSIONES

LOS inhibidores enzimáticos de la metanogénesis representan una de las estrategias nutricionales con mayor potencial para reducir las emisiones de CH₄ en rumiantes. En particular, el

compuesto NOP ha demostrado ser a la fecha la solución más prometedora para disminuir la contribución de la ganadería al cambio climático. Esto debido a su efectividad para reducir la producción de CH₄ a largo plazo sin afectar negativamente la producción animal. Sin embargo, antes de su eventual aprobación para uso animal y su posterior adopción a nivel de granja existen otros factores que deben ser evaluados. Es necesario comprobar que el uso de NOP es seguro para los humanos, los animales y el ambiente antes de su registro para uso animal. Por tanto, es esencial que este compuesto no se acumule en la carne o leche de los animales que lo consuman. Para su adopción en granja, el NOP debe ser de fácil implementación, debe de mejorar el comportamiento productivo de los animales y tiene que ser producido y comercializado a un costo compatible con la industria de la nutrición animal. Es más probable que el uso de NOP se adopte en sistemas de producción intensiva donde los animales consumen el alimento directamente en un comedero. En el caso de sistemas de producción extensivos, en condiciones de pastoreo, es posible que su uso sea limitado, a menos que se puedan desarrollar tecnologías para dosificar NOP bajo estas condiciones. La naturaleza sintética del NOP puede ser una barrera para su adopción debido a la creciente percepción pública negativa hacia este tipo de productos. Sin embargo, dada la creciente demanda de alimentos producidos de forma sustentable, el uso de un producto como el NOP en la producción de carne y leche puede resultar atractivo.

LITERATURA CITADA

- Abecia L., Toral P. G., Martín-García A. I., Martínez G., Tomkins N.W. Molina-Alcaide E., Newbold C.J., Yañez-Ruiz D.R. 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *Journal of Dairy Science* 95: 2027-2036.
- Bauchop T. 1967. Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues. *Journal of Bacteriology* 94: 171-175.
- Czerkawski J. W., Breckenridge G. 1975. New inhibitors of methane production by rumen microorganisms. Experiments with animals and other practical possibilities. *British Journal of Nutrition* 34: 447-457.
- Duin E. C., Wagner T., Shima S., Prakash D., Cronin B., Yañez-Ruiz D.R., Duval S., Rumbeli R., Stemmler R.T., Thauer R.K., Kindermann M. 2016. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: 6172-6177.
- Duval S., Kindermann M. 2012. Use of nitrooxy organic molecules in feed for reducing enteric methane emissions in ruminants, and/or to improve ruminant performance. World Intellectual Property Organization. International Patent Application WO 2012/084629 A1.
- Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Faluccci A., Tempio G. 2013. Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma, Italia.
- Haisan J., Sun Y., Guan L.L., Beauchemin K.A., Iwaasa A., Duval S., Barreda D.R., Oba M., 2014. The effects of feeding 3-nitrooxypropanol on methane emissions and productivity of Holstein cows in mid lactation. *Journal of Dairy Science* 97: 3110-3119.
- Haisan J., Sun Y., Guan L.L., Beauchemin K.A., Iwaasa A., Duval S., Kindermann M., Barreda D.R., Oba M. 2017. The effects of feeding 3-nitrooxypropanol at two doses on milk production, rumen fermentation, plasma metabolites, nutrient digestibility, and methane emissions in lactating Holstein cows. *Animal Production Science* 57: 282-289.
- Hristov A. N., Oh J., Giallongo F., Frederick T.W., Harper M.T., Weeks H.L., Branco A.F., Moate P.J., Deighton M.H., Williams S.R.O., Kindermann M., Duval S. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk

- production. Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A. 112: 10663-10668.
- Hristov A. N., Oh J., Lee C., Meinen R., Montes F., Ott T., Firkins J., Rotz A., Dell C., Adesogan A., Yang W., Tricarico J., Kebreab E., Waghorn G., Dijkstra J., Oostin S. 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production – A review of technical options for non-CO₂ emissions. [P. J. Gerber, B. Henderson, H.P.S. Makkar, editors]. FAO Animal Production and Health Paper No. 177. FAO, Rome, Italy.
- Immig I., Demeyer D., Fiedler D., Van Nevel C., Mbanzamihigo L. 1996. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. Arch. Tierernaehr. 49: 363–370.
- Johnson E.D., Wood A.S., Stone J.B., Moran Jr. E.T. 1972. Some effects of methane inhibition in ruminants (steers). Canadian Journal of Animal Science 52: 703-712.
- Johnson K.A., Johnson D.E. 1995. Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science 73: 2483-2492.
- Knight T., Ronimus R.S., Dey D., Tootill C., Naylor G., Evans P., Molano G., Smith A., Tavendale M., Pinares-Patiño C.S., Clark H. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. Animal Feed Science and Technology 166-167: 101-112.
- Martínez-Fernández G., Abecía L., Arco A., Cantalapiedra-Hijar G., Martín-García A.I., Molina-Alcaide E., Kindermann M., Duval S., Yáñez-Ruiz D.R. 2014. Effects of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol on ruminal fermentation, microbial abundance, and methane emissions in sheep. Journal of Dairy Science 97: 3790-3799.
- McBride B.C., Wolfe R.S. 1971. A new coenzyme of methyl transfer, coenzyme M. Biochemistry 10: 2317-2324.
- Plaa G.L. 2000. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 40: 43-65.
- Romero- Pérez A., Okine E.K., McGinn S.M., Guan L.L., Oba M., Duval S.M., Kindermann M., Beauchemin K. A. 2014. The potential of 3-nitrooxypropanol to lower enteric methane emissions from beef cattle. Journal of Animal Science 92: 4682-4693.
- Romero- Pérez A., Okine E.K., McGinn S.M., Luan L.L., Oba M., Duval S.M., Kindermann M., Beauchemin K.A. 2015. Sustained reduction in methane production from long-term addition of 3-nitrooxypropanol to a beef cattle diet. Journal of Animal Science 93: 1780-1791.
- Thauer R. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. Microbiology 144: 2377-2406.
- Tomkins N.W., Colegate S.M., Hunter R.A. 2009. A bromochloromethane formulation reduces enteric methanogenesis in cattle fed grain-based diets. Animal Production Science 49: 1053-1058.
- Trei J.E., Parish R.C., Singh Y.K., Scott G.C. 1971. Effect of methane inhibitors on rumen metabolism and feedlot performance of sheep. Journal of Dairy Science 54: 536-539.
- Van Nevel C.J., Henderickx H.K., Demeyer D.I., Martin J. 1969. Effect of chloral hydrate on methane and propionic acid in the rumen. Applied Microbiology 17: 695-700.
- Vogels G.D., Hoppe W.F., Stumm C.K. 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. Applied and Environmental Microbiology 40: 608-612.
- Vyas D., McGinn S.M., Duval S., Kindermann M., Beauchemin K.A. 2016a. Effects of sustained reduction of enteric methane emissions with dietary supplementation of 3-nitrooxypropanol on growth performance of growing and finishing beef cattle. Journal of Animal Science 94: 2024-2034.
- Vyas D., McGinn S.M., Duval S., Kindermann M., Beauchemin K.A. 2016b. Optimal dose of 3-nitrooxypropanol for decreasing enteric methane emissions from beef cattle fed high-forage and high-grain diets. Animal Production Science <https://doi.org/10.1071/AN15705>.

