



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Influencia del aceite de girasol y las microalgas de
Schizochytrium en las emisiones de metano ruminal y dióxido de
carbono en cabras**

**“Influence the sunflower oil and *Schizochytrium*
microalgae on ruminal methane and carbon dioxide
emissions in goats”**

**ARTICULO ESPECIALIZADO PARA
PUBLICAR EN REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**PRESENTA
ABNER GARDUÑO GARDUÑO**

ASESORES:

Dra. Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour
Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem
M. en C. Jose Pablo Medina Navarro



TOLUCA, MÉXICO, OCTUBRE DE 2018.

CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
REFERENCIAS.....	32
ANEXO 1 ARTÍCULO.....	33
Influence the sunflower oil and <i>Schizochytrium microalgae</i> on ruminal methane and carbon dioxide emissions in goats.....	33

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes constituyen una importante fuente de alimentos y otros productos para los seres humanos. Estos animales se han adaptado de tal manera que pueden satisfacer sus necesidades energéticas a través de la utilización de los forrajes, los cuales son relativamente abundantes en la superficie terrestre, aspecto que los coloca entre los animales de más alto interés zootécnico (Bocourt y Galindo, 2008).

Los rumiantes se distinguen del resto de los animales por la adaptación morfofisiológica de la parte anterior de su estómago. Esta peculiaridad les permite convertir alimentos fibrosos y proteínas de baja calidad, incluso el nitrógeno no proteico, en nutrientes de calidad, como son la proteína microbiana y los ácidos grasos volátiles (Dewhurst et al. 2000). Estos dependen del juego simbiótico entre la cavidad retículo ruminal (redecilla y panza o rumen) y el medio interno. Así, el proceso fabril ruminal le entrega al medio interno sus productos finales y parte de sus obreros (bacterias, protozoarios y hongos) como proveedores de materias primas nutritivas básicas, para que el mismo pueda satisfacer una proporción importante de los requerimientos de mantenimiento y producción, variando el porcentaje aportado según se modifiquen: el peso vivo, la producción (kg carne, kg leche-grasa), y el medio ambiente (presión, humedad y temperatura) - (Ledesma Arocena. 1987).

Sin embargo, esta capacidad de absorción tiene consecuencias, la producción de gases de efecto invernadero que los rumiantes generan es un problema que afecta al ecosistema, se sabe que uno de los gases que genera mayor contaminación ambiental es el metano, La emisión de metano entérico representa un 30% de las emisiones de metano de origen antropogénico y un 50% de las provenientes del sector agrícola (Solomon et al., 2007).

El metano es un gas de efecto invernadero con 23 veces mayor potencial de calentamiento global que el dióxido de carbono y un tiempo de vida media de 10 años en la atmósfera (Solomon et al., 2007). La producción de metano entérico constituye una pérdida energética para el rumiante que representa entre el 2 y el 12% de la energía bruta consumida (Johnson y Johnson, 1995). Es por esto que algunos autores han propuesto que para la disminución de las emisiones de metano entérico puede ser una estrategia el aumento de la productividad animal (al disminuir las pérdidas energéticas) disminuyendo al mismo tiempo el impacto ambiental (al disminuir las emisiones de metano a la atmósfera) (Neely et al., 2009).

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DIGESTIVA DEL CAPRINO

Órganos de prensión

Los rumiantes muestran variaciones anatómicas resultado de la evolución que favoreció la selectividad por alimentos específicos. Esto llevó a Hofmann (1988) a clasificarlos en tres tipos morfofisiológicos de alimentación: los seleccionadores de concentrados, los consumidores de forraje y los intermedios. Los rumiantes intermedios, como la cabra, consumen una dieta mixta.

Están conformados por los labios, la lengua, los incisivos inferiores y el cojinete dental la cabra se caracteriza por poseer una lengua larga y móvil y labios muy flexibles. La fórmula dentaria de la cabra es la siguiente: $(I\ 0/4\ C\ 0/0\ P\ 3/3\ M\ 3/3) = 32$.

Muestra el mayor grado de desarrollo evolutivo de todos los mamíferos y está formado por el retículo, el rumen, el omaso y el abomaso.

Los tres primeros se consideran pre-estómagos y su función es:

- almacenar el alimento ingerido
- iniciar el proceso de fermentación microbiana anaeróbica del material vegetal y de la absorción de los productos de esta misma.

Rumen

Compartimiento más voluminoso. Su volumen es aproximadamente el 75% de los cuatro departamentos. Se encuentra situado en el flanco izquierdo de la cavidad abdominal, está dividido por medio de pilares o tabiques en cuatro sacos. Los sacos mayores, el dorsal y el ventral, tienen comunicación entre sí y con el retículo, mientras que los sacos pequeños caudales no tienen comunicación con el exterior y se les denominan sacos ciegos dorsal y ventral (Díaz 2008).

Según Church (1979) el rumen se desarrolla anatómicamente a partir de la porción no secretora del estómago. El aparato digestivo de los rumiantes al nacer funciona muy parecido al de los monogástricos, debido a que el rumen tiene un desarrollo muy rudimentario.

Sin embargo, su especial pauta de motilidad ya está perfectamente establecida desde el nacimiento. El desarrollo del rumen implica, por lo tanto, la implantación de la masa microbiana y la capacidad de absorción de nutrientes, siendo importante el tiempo que transcurra entre el desarrollen morfofisiológico digestivo y los procesos digestivos de fermentación ruminal dada por la relación simbiótica establecida con los microorganismos ruminales (Orskov, 1988).

Reticulo

Situado en la parte anterior de la cavidad abdominal, separado del rumen por el pliegue reticuloruminal. Con comunicación interna por la parte superior. Se puede decir que el rumen y el retículo son 7 considerados un solo órgano separados por el pliegue rumino-reticular lo que posibilita el intercambio de digesta y un mayor sitio de fermentación y absorción de ácidos grasos volátiles.

El retículo rumen se encarga de:

- Preparación del alimento para la digestión química en el abomaso e intestino delgado.
- Mezcla del alimento y degradación de la celulosa por bacterias y protozoos
- Regurgitación y remasticación del alimento en la boca.
- Distribución del alimento remasticado en el rumen-retículo y paso al omaso.
- Eliminación de los gases que se acumulan por la actividad bacteriana.

El retículo – rumen tiene apariencia rugosa por la presencia de las papilas. Estas papilas son mayores en los sacos dorsal y ventral lo que incrementa la superficie de absorción. Esto constituye una forma de adaptación a las necesidades absorptivas del órgano y este no posee capacidad secretora (Van Soest, 1982).

Canal Reticular

El rumen está conectado con el omaso, a través de un cuello corto y estrecho que termina en el llamado orificio retículo omasal que se extiende desde el cardia hasta el omaso. El orificio retículo omasal está formado por dos pliegues musculares que se cierran para dirigir los alimentos líquidos desde el esófago hasta el abomaso sin pasar por el rumen. El cierre se produce por un reflejo que inicialmente se atribuyó a algunas sustancias presentes en la leche, sin embargo, en la actualidad existen evidencias de que el patrón de comportamiento, unido con la estimulación táctil de la teta que proporciona la leche, son los responsables del cierre del canal (Orskov, 1990).

El canal reticular es más funcional en los animales lactantes que lo utilizan para pasar la leche directamente desde el esófago hacia el abomaso. En el rumiante adulto sólo funciona si se ha mantenido el estímulo para el cierre, suministrando los nutrientes con tetetas o algunas soluciones minerales de cobre y de sodio que provocan un efecto similar.

Omaso

Situado en la parte derecha de la cavidad abdominal. Conectado con el retículo (orificio retículo-omasal) y con el abomaso. El omaso tiene forma elipsoidal, presenta papilas longitudinales y anchas en forma de hojas o láminas que emergen de las paredes del órgano y se disponen en orden de tamaño en varias hileras. La función del omaso aún no se comprende totalmente, pero parece ser que atrapa las partículas pequeñas de la ingesta, comprime los alimentos y extrae líquido. Además en este órgano se absorbe agua y otras especies moleculares pequeñas (N-NH_3 , ácidos grasos volátiles, electrolitos inorgánicos, etc).

El omaso, contrarresta, por absorción, el exceso de carga ácida, osmótica, acuosa o amoniacal de dicho contenido con lo que protege al abomaso y al duodeno de la llegada de un quimo anormal y asegura una buena digestión (Asocras, 2000).

Abomaso

El abomaso es un saco alargado que se encuentra en su mayor parte en el suelo del abdomen. Constituye la región glandular del estómago de los rumiantes y es equivalente al estómago de los monogástricos. En esta región ocurre la verdadera digestión ante la presencia de ácido clorhídrico y enzimas. (Silva y Perez 2008)

Intestinos.

El abomaso y el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) parecen tener funciones similares en los rumiantes y en los monogástricos. Es en estos órganos donde los residuos no fermentados de los alimentos y los microorganismos ruminales se someten a la digestión enzimática y sus productos se absorben para ser utilizados en los diferentes procesos metabólicos en dependencia del fin productivo del animal. (Preston y Leng, 1987; Forbes y Frences, 1993).

El intestino grueso (ciego y colon) se une al íleon, a través del orificio ileocecal. El ciego y el colon son áreas de colonización microbiana y fermentación de aquellas fracciones alimentarias que sobrepasan la fermentación ruminal y la digestión en el intestino delgado. Las bacterias presentes en el intestino grueso difieren muy poco de las del rumen. La producción de ácidos grasos volátiles que se absorbe desde el intestino grueso representa una fracción muy variable, de 4 a 26 % de la energía total digerida.

Fisiología de la digestión

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje. Esta característica se basa en la posibilidad de poder degradar los hidratos de carbono estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digeribles para las especies de estómago simple o no-rumiantes. Basada en esta diferencia fundamental, la fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares. La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas

digestivas, y los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales (Relling y Mattioli 2009).

La digestión fermentativa depende del normal desarrollo de los microorganismos que la realizan. Por esta razón, el rumiante crea y mantiene a nivel retículo-ruminal las condiciones ideales para su crecimiento y multiplicación, convirtiéndose en un “gigantesco medio de cultivo líquido” (Relling y Mattioli 2009).

Según Preston y Leng (1987) el tipo de alimento, así como la cantidad consumida, el mezclaje periódico dado por las contracciones ruminales, la salivación, la rumia y la difusión-secreción hacia el rumen, son factores que controlan el ambiente ruminal, perturbándose este, solo en condiciones anormales drásticas.

Las condiciones retículo-ruminales para el desarrollo de los microorganismos incluyen: aporte de nutrientes, anaerobiosis, pH, presión osmótica, temperatura, fácil acceso de los microorganismos al alimento y eliminación de los productos de desecho de este sistema.

Aporte de nutrientes.

Debe tenerse en cuenta que la nutrición del rumiante depende de la nutrición de su micropoblación ruminal. Esta degrada parcial o totalmente los componentes de la dieta, por lo cual puede aceptarse que en realidad se está alimentando al rumen para que luego éste alimente al rumiante.

Anaerobiosis.

El metabolismo anaerobio de los microorganismos ruminales es el factor responsable de la simbiosis con el rumiante.

PH.

La flora normal del rumen desarrolla en un rango de pH de 5,5 a 6,9. Fuera de éste, el pH extremo favorece el desarrollo de otros microorganismos que alteran el patrón metabólico del rumen y enferman al rumiante. La cantidad de H⁺ producido va a depender del tipo de dieta y el tipo de microorganismo que fermente dicho nutriente. Lo cual determinara también la “eficiencia” de ese alimento debido a la producción de metano y tipo de acidos grasos volatiles.

Presión osmótica.

El contenido ruminal mantiene una presión osmótica semejante a la tisular (alrededor de 300 miliosmoles/litro), para evitar pérdidas desmedidas de agua desde el líquido intersticial hacia el rumen o viceversa. Usualmente la presión osmótica se mantiene en 280 mOsm/l incrementándose en el período post-prandial por la mayor producción de acidos grasos volatiles.

Temperatura.

Es otro de los factores que condicionan el desarrollo bacteriano. Producto de las reacciones químicas dentro del rumen y de la regulación homeotérmica del rumiante, la temperatura ruminal se mantiene entre 38 y 42°C.

(Relling y Mattioli 2009)

Se puede decir entonces que la digestión microbiana que tiene lugar en el rumen es la piedra angular de la fisiología digestiva del rumiante. En el rumen se modifica el alimento consumido, se degradan la celulosa y los carbohidratos solubles, se altera la secuencia de aminoácidos de las proteínas y se sintetizan algunas vitaminas del Complejo B. (Bocourt y Galindo 2008)

Digestión microbiana de los hidratos de carbono

A partir de los hidratos de carbono se obtienen los compuestos de mayor importancia energética para los rumiantes, los acidos grasos volatiles. Estas sustancias se absorben desde el RR y producen entre el 50-80 % de la energía metabolizable (EM) que ingiere el animal. Los carbohidratos a su vez, son los

precursores más importantes en la síntesis de grasa y azúcar (lactosa) para la leche.

Los carbohidratos utilizan vías diferentes hasta convertirse en piruvato que es el intermediario universal en la síntesis de los ácidos grasos volátiles. El óxido reducción de piruvato seguida por una descarboxilación conduce a la formación de acetil-CoA que a su vez, se transforma en acetato. El butirato se forma por condensación de dos moléculas de acetil-CoA y el propionato tiene dos vías de formación; a partir del succinato y del ácido láctico. En general los azúcares y los carbohidratos solubles se degradan rápidamente, mientras que los polisacáridos estructurales son atacados con rapidez variable. Los materiales de más difícil degradación son la celulosa y la hemicelulosa, cuya estrecha asociación con la lignina los hace menos asequible a la acción microbiana.

Según Sodio, (2004) la fermentación es el último paso en la digestión de los carbohidratos, la cual provee de ATP a los microorganismos, este paso también es esencial para producir ácidos grasos volátiles para el metabolismo energético de los animales. Los mamíferos poseen enzimas en su tracto digestivo capaces de convertir el almidón y los azúcares solubles en glucosa que desde el punto de vista energético es superior a los ácidos grasos volátiles. Sin embargo, estos carbohidratos son fermentados en el rumen lo que constituye una pérdida energética inevitable para el rumiante.

La concentración total de ácidos grasos volátiles en el rumen y las cantidades de cada uno de ellos dependen de la dieta. En dependencia de la fuente de carbohidratos variará la cantidad y la relación de ácidos grasos volátiles producidos. A continuación se muestra como los cambios en la dieta pueden modificar el patrón de fermentación.

Digestión de los compuestos nitrogenados

El estudio de las particularidades del rumiante en la digestión de los compuestos nitrogenados reúne aspectos de gran interés económico. La

producción de proteína microbiana, a partir de los compuestos químicos no proteicos, junto a la digestión de la fibra, ofrecen una forma de producir alimentos para el hombre a partir del material no utilizable directamente para el consumo humano. De este modo el rumiante se sitúa en el papel central del uso efectivo de los recursos nutritivos en el mundo (Ruiz y Ayala, 1987).

Las proteínas proporcionan los aminoácidos requeridos para el mantenimiento de las funciones vitales como reproducción, crecimiento y lactancia. Los animales no-rumiantes necesitan aminoácidos preformados en su dieta, pero los rumiantes pueden utilizar otras fuentes de nitrógeno porque los 11 microorganismos que habitan el rumen tienen la habilidad especial de sintetizar aminoácidos y de formar proteína a partir nitrógeno no-proteico.

Los compuestos nitrogenados de origen dietario que llegan al rumen incluyen varios tipos de proteína que pueden diferir marcadamente en el contenido de aminoácidos y solubilidad entre los que se incluyen: a) Proteínas moleculares que contienen bases púricas y pirimidínicas. b) El nitrógeno no proteico en forma de aminoácidos, péptidos, amidas aminas, sales de amonio, nitratos, nitritos y la urea. c) Las proteínas vegetales que hacen el mayor aporte de N y están constituidas por las fracciones proteicas de las hojas, nitrógeno no proteico, además de pequeñas fracciones de enzimas de los cloroplastos, membranas y proteínas nucleares y mitocondriales. Al rumen también llega N de origen endógeno que incluye fundamentalmente las decamaciones de los tejidos epiteliales, la urea que aporta la saliva y la que difunde, a través de la pared ruminal. Los rumiantes poseen además, un mecanismo para ahorrar nitrógeno. Cuando el contenido de nitrógeno en la dieta es bajo, la urea, un producto final del metabolismo de las proteínas en el cuerpo, puede ser reciclada al rumen en grandes cantidades y los microorganismos la utilizan para sintetizar proteína.

En el rumen, cierta cantidad de proteína dietaria puede escapar a la digestión ruminal y pasar al intestino sin modificarse en el rumen, a ésta se le denomina

proteína sobrepasante (proteína by-pass). La proteína microbiana representada por los cuerpos celulares de los microorganismos, pasa con las proteínas de la ración que no fueron modificadas por la microflora ruminal a través del omaso, abomaso, hasta el intestino en donde son digeridas por acción de las enzimas pepsina, tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa y aminopeptidasa en forma similar a la digestión proteica en los monogástricos. De los nutrientes nitrogenados que consumen los rumiantes, entre 25 a 50 % llega al ciego, donde hay actividad de enzimas proteolíticas, ureolíticas y desaminasas, lo cual explicaría la elevada concentración de amoníaco en el contenido cecal. El amoníaco absorbido desde el ciego es convertido a urea en el hígado y puede ser reciclado hacia el rumen vía saliva (Relling y Mattioli 2009).

Transformación de proteína en el rumen

La microflora ruminal altamente proteolítica, representa entre 30-50 % de la población bacteriana. Las bacterias degradan la mayor parte de las proteínas en péptidos y aminoácidos, una alta proporción de los aminoácidos son desaminados hasta NH_3 y cadenas carbonadas. Estas últimas se utilizan para la síntesis de ácidos grasos ramificados. La velocidad y magnitud de la degradación proteica en el rumen varía entre proteínas de diferentes fuentes y también depende del nivel de la actividad proteolítica (que es altamente variable) del tiempo de estancia de la proteína en el rumen, del pH y las especies microbianas presentes, influyendo directamente el tipo de dieta en la actividad proteolítica (Relling y Mattioli 2009).

Digestión ruminal de los lípidos

Los lípidos de los pastos son la fuente principal de grasa para los rumiantes. Usualmente la dieta consumida por los rumiantes contiene sólo 4-6% de lípidos, en base seca. Sin embargo, ellos son parte importante de la ración de una vaca lechera porque contribuyen directamente a casi 50% de la grasa en la leche y son la fuente más concentrada de energía en los alimentos (Wattiaux, 2000).

La adición de grasa a la dieta de los rumiantes influye en el comportamiento de la fermentación ruminal y en la secreción de la grasa láctea. Un exceso en la ración resulta negativo en la digestibilidad de la fibra. Actualmente las grasas se saponifican para formar jabones de calcio u otros, lo que permite su mayor utilización.

Absorción ruminal

Como se ha venido reflejando los ácidos grasos volátiles son de suma importancia ya que representan más del 70% del suministro de energía al rumiante. Virtualmente todo ácido acético, propiónico y el ácido butírico son absorbidos por el epitelio del rumen y transportados vía porta al hígado. La absorción de ácidos grasos volátiles no sólo es importante para mantener su distribución en las células animales, sino para prevenir cantidades excesivas que puedan alterar el pH ruminal. (Nava, 2001).

El epitelio estratificado del rumen generalmente no se caracteriza por una eficaz absorción. No obstante es capaz de absorber eficientemente ácidos grasos volátiles, ácido láctico, electrolitos y agua. La superficie del epitelio es muy extendida debido a la formación de papilas bien vascularizadas. De los ácidos grasos volátiles, el 85 % se absorbe en el rumen, el 10 % en el omaso y abomaso, y un 5 % puede pasar al intestino. El ácido butírico tiene mayor metabolismo en el epitelio, convirtiéndose en cuerpos cetónicos (β -hidroxibutírico); en caprinos se metaboliza 80 a 85% del butírico absorbido. En el epitelio ruminal, 50 a 70 % del ácido propiónico se metaboliza a ácido pirúvico y láctico, aunque posiblemente esté limitado por la actividad de la propionil-CoA sintetasa; el ácido láctico que aparece en la sangre deriva de la glucólisis en el epitelio. Durante la absorción ruminal, alrededor de 30 % del ácido acético se metaboliza y la limitación principal es la baja actividad de la acetil-CoA sintetasa del epitelio ruminal. Entonces, la absorción de los ácidos grasos volátiles puede explicarse en términos de difusión; este proceso es modificado por el metabolismo epitelial de los ácidos, el pH ruminal, el gradiente de concentración entre el contenido ruminal, el epitelio y la sangre, así como la asimetría en la permeabilidad de las membranas.

En rumiantes alimentados con dietas concentradas, la liberación de ácido láctico aumenta a medida que se incrementa el grano en la dieta; este compuesto también se absorbe a través del epitelio ruminal. En ovinos, 3.5 h después de una infusión de ácido láctico directamente al rumen, había desaparecido 95: 57% por absorción, 34 % por metabolismo y utilización por microorganismos, y 9% por pasaje al tubo digestivo posterior. En condiciones anormales, como una acidosis láctica, la disminución del pH y el aumento en la concentración de ácido láctico, causa un incremento significativo en la cantidad absorbida (González, 2002).

Los ácidos grasos volátiles absorbidos tienen diferentes destinos metabólicos. (Nava, 2001)

- El ácido acético se oxida en los diferentes tejidos para generar ATP. También funciona como la principal fuente de acetil-CoA para la síntesis de lípidos corporales de reserva y de la grasa de la leche.
- El “ácido propiónico” es el único de los ácidos grasos volátiles que el hígado puede transformar en glucosa, en la vía de la gluconeogénesis. De esta manera, las moléculas de glucosa sintetizadas en este proceso serán exportadas hacia los tejidos corporales (principalmente el nervioso, el cardíaco y el sanguíneo), quienes serán los encargados de utilizarla como fuente de energía para la síntesis de ATP. Además, la glucosa es utilizada para la formación de glucógeno (reserva de energía) en los músculos y para la síntesis de la lactosa de la leche.
- El ácido butírico absorbido en forma de ácido β -hidroxibutírico, es oxidado en muchos tejidos para la producción de energía.

El agua atraviesa libremente el epitelio ruminal y, al comienzo de la digestión, grandes volúmenes de agua entran al rumen a través del epitelio debido al incremento de la presión osmótica del contenido ruminal. La absorción de los productos de la fermentación y el paso del quimo alimenticio hacia el tubo digestivo posterior, reduce la presión osmótica del líquido ruminal y se observa

un flujo de agua desde el rumen hacia el epitelio. Sin embargo, a pesar de que el flujo de agua desde y hacia el rumen es muy grande durante el día, el flujo neto diario es cercano a cero. En sentido general el metabolismo del rumiante se encuentra enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los Ácidos Grasos Volátiles, sin embargo, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, también los hay no útiles como el metano o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos. (Owens y Goetsch, 1986).

Así como algunos suelen ser contaminantes del para el medio ambiente como es el caso del ya mencionado Metano.

Proceso de Metanogénesis

El metano se forma en el rumen por la acción de las bacterias metanogénicas que reducen el CO₂ de las cuales hablaremos en acápite posteriores. Se considera el ácido fórmico como la fuente más probable de hidrógeno para que ocurra esta reacción. El metano constituye una pérdida energética considerable, ya que representa entre 7 y 8 % de la energía bruta consumida. Las pérdidas que originan la producción de metano pueden fluctuar entre 2.5-33 millones de t de alimento anuales (Ruiz y Dearriba, 1987).

El metano constituye además un gas contaminante del ambiente. Se ha estimado que la población de rumiantes del mundo produce 77, 000 000 t de metano anualmente, lo cual constituye alrededor del 15 % de la emisión total del gas atmosférico (Mc Allister et al. 1996, Asanuma, 1999) (Citados por Delgado, 2006), por lo que disminuir su producción, a través de una mejora en la eficiencia de la fermentación ruminal, debe ser objetivo principal en la ganadería.

2.3 Microorganismos ruminales

Los microorganismos ruminales han habitado en él durante poco más de 70 millones de años y se ha formado una relación de ecología (Oekologie, del

griego oikos que significa “casa” y logos “ciencia”) ruminal, donde el rumen es un ecosistema microbiano con complejas interrelaciones.

El sistema microbiano ruminal es un activo proceso regulado mediante complejos mecanismos bioquímicos. En el rumen existe una fase gaseosa donde podemos encontrar metano (CH₄) y CO₂, y otra acuosa que tiene dos estratos: estrato ventral (90% agua y 10% MS), donde están las partículas de alimento de mayor densidad y de forraje con más de 12 h de digestión; estrato superior (80% agua y 20% MS) conformado por un manto de forraje de baja densidad. Por tanto, los estratos difieren en composición y actividad microbiana; en la fase acuosa los microorganismos son anaerobios estrictos, con una menor cantidad de anaerobios facultativos. Las bacterias forman la mayor parte de esos microorganismos, hay un máximo de 40 % de protozoarios y menos de 8 % de hongos. Cheng y Costerton (1980) postularon que los microorganismos del rumen pueden ser clasificados en tres grupos: (I) los microorganismos que se adhieren a la pared del rumen, (II) los que viven libremente y (III) los que están adheridos a las partículas del alimento. Este último grupo representa 75 % del total de microorganismos ruminales y desde el punto de vista ecológico son los que presentan las mayores ventajas, ya que los otros pueden ser removidos del rumen más rápidamente por el flujo de la digesta. Un factor importante para alcanzar una actividad microbiana óptima es que los microorganismos dispongan de los sustratos necesarios para su mantenimiento y crecimiento. En ausencia de energía fermentable y algunos otros nutrientes exógenos, el 60% de las bacterias ruminales podrían morir en un lapso de tiempo de 2 horas y alrededor del 30 % o más podrían lisiarse debido a la inanición (Hespell, 1979).

Bacterias

Cada mililitro de contenido ruminal alberga alrededor de 10 000 a 50 000 millones de bacterias, siendo estos los microorganismos más abundantes. Las bacterias se encuentran en una gran variedad de géneros y especies por lo menos 28 especies funcionalmente importantes, las cuales se agrupan de

acuerdo a su actividad. La mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas, que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, sin embargo también se encuentran presentes organismos facultativos. Las bacterias en el rumen contribuyen al desarrollo de las funciones ruminales en los chivos en etapa de prerumiantes preparando al rumen para el destete.

Las bacterias del rumen se adaptarán a los cambios en el medio ambiente ruminal rápidamente. Usualmente, alrededor de las 2 semanas después de introducir alimentos hacia el rumen, las bacterias en el rumen del ternero van a parecerse a las que se encuentran en animales adultos. (Quigley, 1997).

Según González, 2002 la mayoría de las bacterias que podemos encontrar en el rumen son anaerobias estrictas, Gram negativas donde se observan bacilos, cocos, cocobacilos, espiroquetas y esporoformes, siendo las principales responsables de fermentación ruminal. Algunos de los principales grupos de bacterias, de acuerdo con el substrato utilizado, son los siguientes:

- Celulolíticas: *Bacteroides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*.
- Hemicelulolíticas: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*.
- Amilolíticas: *Bacteroides amylophilus*, *B. ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amilolítica*.
- Proteolíticas: *Bacteroides amylophilus*, *B. ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*.
- Pectina: *B. fibrisolvens* y *Lachnospira multiparus* y varios protozoarios.

A pesar del papel de las poblaciones protozoaria y fúngica del rumen en la digestión de la pared celular vegetal, parece claro que son las bacterias los microorganismos más activamente implicados en este proceso, tanto cualitativamente, por su alta actividad enzimática, como a nivel cuantitativo, por la magnitud de su repercusión debida a su elevada concentración en el rumen (Relling y Mattioli 2009).

Bacterias metanogénicas

Las bacterias metanogénicas forman parte del dominio de las Archeobacterias, que incluye tres tipos de bacterias: metanogénicas, las que producen metano; halófilas extremas, las que viven en medios salinos extremos, y termoacidófilas, las que subsisten en ambientes calientes y ácidos. De los tres tipos las que predominan son las metanogénicas y han sido estudiadas por un gran número de autores (Galindo, 2006). Los metanógenos poseen coenzimas que son comunes en otras bacterias, incluyendo vitamina B12, sin embargo, un aspecto especial de estos microorganismos es la presencia en ellos de un grupo de coenzimas que son únicas o de limitada distribución (Stewart y Bryant 1988).

La clasificación de las bacterias metanogénicas se basa en la estructura del ARNr 16S. Aunque en los diferentes hábitats anaeróbios, se han identificado alrededor de 70 especies de microorganismos metanogénicos pertenecientes a 21 géneros, solo 7 especies han sido aisladas del rumen (Tajima et al. 2001). Las bacterias metanogénicas encontradas en el rumen son las siguientes: *Methanobacterium formicicum bryantii*; *Methanobrevibacter ruminantium smithii*; *Methanomicrobium mobile*; *Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi*. Han sido encontrado grupos de bacterias metanogénicas sobre la superficie del protozooario entodiniomorfo, estando controlada su actividad probablemente por la concentración de hidrógeno en el líquido ruminal. La densidad de methanogens sobre la superficie de los protozoarios es reducida por un suplemento de hidrógeno exógeno, y es incrementada por un suplemento de nitrógeno. Esto sugiere que methanogens se adhiere a los protozoarios para usar el hidrógeno ya que la acumulación de este puede afectar negativamente la actividad metabólica de los protozoarios.

Protozoos

Los protozoarios se conocen desde 1843, el contacto con otros animales parece ser la principal vía de inoculación, siendo esta la única para el

establecimiento de los protozoos. Las bacterias pueden inocularse en el rumen mediante el alimento, el medio o incluso los *Lactobacillus* se inoculan por reflujo de contenido lácteo del abomaso (Roy, 1980) -(Citado por Rotger 2005).

La población de protozoarios en el rumen es menor a la de las bacterias, encontrándose en concentraciones de 1 millón por ml de contenido ruminal, aunque su número es menor en comparación con las bacterias, estos microorganismos tienen un mayor volumen individual, dando lugar a una masa celular de protozoarios semejante a la masa de las bacterias. Los protozoarios flagelados utilizan azúcares simples y bacterias como substratos: *Monocercomonas ruminantium*, *M. bovis*, *M. caprae*, *Trichomonas ruminantium*, *Tetratrichomonas ruminantium*. El efecto de los protozoos sobre la digestión de la fibra vegetal depende del papel y de la importancia relativa de los distintos géneros y especies en el ecosistema ruminal (Jouany et al., 1994 y Williams et al., 1988) -(Citados por Fondevila, 1998).

En general, la presencia de protozoos aumenta, directa o indirectamente, la digestión ruminal de celulosa y hemicelulosas respecto a animales defaunados. Aunque las actividades enzimáticas endoglucanasa, β -celobiosidasa y β -glucosidasa —implicadas en la hidrólisis de celulosa— por una parte, y hemicelulasa y xilanasas, por otra, están ampliamente distribuidas entre los protozoos del rumen (Williams et al., 1984). En sentido general la capacidad de los protozoos de adherirse a las partículas de pared celular es reducida, excepto en el caso de los holótricos, estimulados probablemente por quimiotactismo hacia azúcares solubles (Bauchop, 1989, Orpin, 1983) (Citados por Fondevila, 1998), aunque su actividad fibrolítica es escasa. Los *Epidinium* se adhieren a las partículas por una zona situada en su parte anterior; luego, vierten enzimas extracelulares que van rompiendo los tejidos vegetales en pequeños fragmentos que son entonces ingeridos y digeridos intracelularmente. Según Bohatier et al., 1990 los grandes entodiniomorfos únicamente tienen actividad enzimática intracelular, y por ello ejercen su acción

degradativa ingiriendo partículas suspendidas en el medio, que luego digieren intracelularmente.

Cunningham en 1997 (Citado por Sodi et al., 2004) reportó que los protozoos ingieren grandes números de bacterias y mantienen constante la cantidad de bacterias ruminales teniendo un efecto negativo sobre las bacterias amilolíticas, debido a que protozoarios como Entodiniomorfo pueden ingerir grandes cantidades de gránulos de almidón, lo que disminuye la disponibilidad de almidón para las bacterias amilolíticas. La ingestión de almidón viene acompañada también por una depredación selectiva de las bacterias amilolíticas que se adhieren a los gránulos de almidón.

Hongos

En el rumen existen también hongos anaerobios, conocidos desde 1974, en una concentración de 10^3 a 10^5 mL⁻¹ fluido ruminal ejemplos de estos lo constituyen: *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis*; *Piromonas communis*, *Orpinomyces*. Se plantea que la población de hongos anaerobios del rumen está directamente relacionada con el contenido en fibra de la dieta, y su proporción disminuye en dietas ricas en almidón o azúcares solubles (Grenet et al, 1989). Los hongos ruminales tienen capacidad enzimática de hidrolizar celulosa y xilano, aunque parece que no pectina (Fonty et al, 1991; Hébraud et al, 1988).

La acción fúngica sobre la pared celular vegetal y su contribución a la digestión ruminal de ésta, parece estar muy relacionada con su activa colonización. Se ha observado mediante microscopía electrónica que las zoosporas son atraídas por quimiotactismo (Bauchop, 1989) (Citado por Fondevila, 1998), y se adhieren rápidamente a las partículas, preferentemente en estomas y zonas de corte de los tejidos lignificados (esclerenquima, xilema), aunque los tejidos vegetales no lignificados (floema, parénquima medular) son los más rápidamente degradados. En este sentido, los hongos ruminales son especialmente activos frente a substratos muy lignificados (Joblin et al., 1989).

De hecho, aunque no está probada su capacidad de utilización de lignina como fuente de nutrientes, *N. frontalis* puede solubilizar pequeñas cantidades de lignina de la pared celular vegetal, probablemente debido a la solubilización de compuestos fenólicos, en mayor medida que las bacterias, aumentando la accesibilidad de los polisacáridos estructurales para las bacterias.

Por otra parte, la acción mecánica de los hongos sobre la pared celular vegetal disminuye la rigidez estructural de los forrajes y favorece la ruptura de las partículas de este aumentando también así la superficie accesible para la acción bacteriana.

2.4 Impacto del consumo de aceites sobre el ambiente ruminal

Los subproductos de plantas oleaginosas han sido utilizados para mejorar el desempeño productivo en ruminantes ya sea por la alta energía que proporciona o por su composición proteica, sin embargo, pocos artículos reportan la cantidad que debe proporcionarse en forma adecuada en la dieta de ruminantes como suplemento (Yong Liu 2015). Modificar el metabolismo microbiano en rumen a través de la adición de aceites derivados de plantas es una manera efectiva de aumentar los ácidos grasos funcionales de los productos derivados de ruminantes (Yong Liu 2015).

2.5 Impacto del consumo de algas en el ambiente ruminal

El CH_4 y el CO_2 son subproductos naturales de la fermentación microbiana de los carbohidratos y, en menor medida, de los aminoácidos en el rumen y el intestino grueso de los animales de granja. El metano se produce en condiciones estrictamente anaeróbicas por procariontes metanógenos altamente especializados, los cuales son todas arqueas. En los rumiantes, la mayor parte del CH_4 entérico se produce en el retículo-rumen. Según Murray et al. (1976) y Muñoz et al. (2012) las emisiones rectales representan alrededor del 2 al 3 por ciento del total de las emisiones de CH_4 .

La inclusion de algas a la dieta es una alternativa para reducir los niveles de CH₄ generados por el proceso digestivo de los rumiantes, esto a traves de un mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. (Boeckeaert 2008).

JUSTIFICACIÓN

Los rumiantes son una de las especies de mayor predilección zootécnica a nivel mundial, representan un porcentaje considerable de la economía mundial debido al consumo de estos, haciendo uso no solo de la carne si no de toda materia prima que los rumiantes pueden ofrecer, es por ello que a lo largo de los años se han realizado investigaciones con el fin de obtener materia prima de mejor calidad y a menor costo haciendo uso de las diferentes herramientas que la ciencia brinda al sector pecuario. Sin embargo estas especies también son una de las principales fuentes de contaminación ambiental a nivel mundial, debido a la liberación de metano y dióxido de carbono que son gases de efecto invernadero derivados de los procesos digestivos de los rumiantes.

El propósito de esta investigación es dar una alternativa para mejorar la calidad de la materia prima obtenida de los rumiantes y al mismo tiempo reducir el impacto ambiental que estos animales generan por su explotación. Esto se pretende a través del mejoramiento de las dietas con aditivos a base de aceite de girasol y microalgas.

HIPÓTESIS

La mezcla de aceite de girasol y microalgas *Schizochytrium* utilizadas como aditivos en una dieta convencional puede reducir los niveles de CH₄ y CO₂ de la digestión ruminal mejorando la calidad de la carne y la leche en los rumiantes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el impacto del uso de aceite de girasol y microalgas *Schizochytrium* en las emisiones de CH₄ y CO₂.

Objetivo específico

Determinar el impacto de la mezcla de aceite de girasol y microalgas *Schizochytrium* a diferentes concentraciones en las emisiones de metano y dióxido de carbono de la digestión ruminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sustrato y tratamientos

Se preparó una ración mixta total como sustrato para contener (/ kg de MS) 400 g de heno de alfalfa (*Medicago sativa*), 250 g de maíz amarillo triturado, 250 g de harina de soja y 100 g de salvado de trigo. La composición química del TMR fue de 880 g MS (base en peso húmedo), 934 g de materia orgánica (MO), 218 g de proteína bruta (PC), 219 g de fibra detergente neutro (FDN) y 201 g Fibra detergente ácida (FDA). La ración mixta total sin aditivo se consideró como un tratamiento de control. Las microalgas de *Schizochytrium* (Xuhuang Bio-Tech Co., Ltd., Shaanxi, China) y SFO de un proveedor local, fueron individualmente o su mezcla a razón de 1: 1 MS (SASO) añadida al ración mixta total a niveles de 1, 2, 3, 4, y 5% sobre la base de DM. La composición química de la SMA se muestra en la Tabla 1. Los ácidos grasos individuales (g / 100 g de ácidos grasos totales) del aceite fueron: 5,4 g, C16: 0; 4,6 g, C{18}: 0; 21,0 g, C18: 1 y 69,0 g, C18: 2.

Fermentación in vitro y biodegradación

El inóculo se recolectó a partir de dos novillos Holstein canulado en rumen (450 ± 20 kg PV) y dos cabras criollas ruminales (50 ± 2 kg de peso corporal), alojadas en corrales individuales y alimentadas con una dieta consistente en heno de avena y concentrado (PURINA®, Toluca, México) a razón de 60:40 ad libitum, con libre acceso al agua. Los animales se alimentaron dos veces al día a las 08:00 y 16:00 h y se manejaron bajo las condiciones estipuladas en la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El contenido del rumen se colocó en un termo plástico precalentado a 39 ° C y se transportó al laboratorio donde se lavó con CO₂, se mezcló y se filtró a través de cuatro capas de estopilla en un matraz con espacio libre de O₂. El contenido de rumen se mantuvo a una temperatura de 39°C con un flujo continuo de CO₂.

Antes del proceso de incubación, se preparó el medio de incubación que contenía disoluciones tampón, macromineral, micromineral y resarzurina y

agua destilada de acuerdo con Goering y Van Soest (1970) y se mezcló en un matraz aforado usando una placa y un agitador magnético fijados a 39°C para mantener el Temperatura y homogeneizar la solución. En consecuencia, el inóculo ruminal y la solución reductora se mezclaron en la relación 1: 4 vol / vol, respectivamente.

Las muestras (0,5 g) del sustrato se pesaron en botellas de suero de 120 ml con adición apropiada de los aditivos (es decir, SMA, SFO o una mezcla de SMA y SFO) / g de MS. En consecuencia, se añadieron 50 ml de licor de rumen previamente preparado y el tampón. Las botellas se mantuvieron a un flujo constante de CO₂ durante 30 segundos, y luego se taparon con tapones de neopreno y luego se sellaron con anillos de aluminio. Los viales se colocaron en una incubadora (Riossa®, F-51 D, Estado de México, México) a 39°C durante 48 h. Además, se incubaron tres botellas como blancos (sólo fluido ruminal) durante 48 h. Se realizaron tres pruebas de incubación en tres semanas.

Las lecturas de producción de gas (PG) se realizaron a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 h de incubación. Se utilizó un aparato de desplazamiento de agua según Fedorak y Hrudey (1983). El aparato se diseñó con un soporte universal, con un embudo cónico, una bureta de 100 ml y dos mangueras de látex de 0,5 y 1 m de longitud y 3/8 pulgadas de diámetro. Los viales se puncionaron con una aguja de calibre 16 colocada en el extremo de la manguera y se midió el volumen de PG (ml) mediante el desplazamiento de agua en la bureta.

Después de 48 h de incubación, se tomaron 5 ml de gas y se almacenaron en viales con solución salina saturada preparada con 400 g de NaCl en 1 l de agua destilada y se añadió el pH ajustado a 2 y 5 ml de naranja de metilo al 20% como indicador Para determinaciones de la concentración de CH₄ y CO₂. La solución salina saturada previamente preparada se almacenó en viales serológicos de 60 ml sin espacio de cabeza y tapones de neopreno colocados y sellados con anillos de aluminio, y almacenados lejos de la luz. Para la

determinación de CH₄ y CO₂, se tomó una muestra de 10 µL de la fase gaseosa de los viales con solución salina saturada y se inyectó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer, Claurus 500 (Ciudad de México, México) con detección de ionización de llama y helio como gas portador. Se utilizó un detector de conductividad térmica con las temperaturas de horno, columna y TCD fijadas a 80°C, 170°C y 130°C, respectivamente. Los tiempos de retención fueron 0,73 min y 1,05 min para CH₄ y CO₂, respectivamente.

Al final de la incubación a las 48 h, el proceso de fermentación se detuvo por remolino de las botellas en hielo durante 5 minutos, a continuación, las botellas fueron sin tapar y el pH se midió inmediatamente usando un medidor de pH (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, ESTADOS UNIDOS). El contenido de las botellas se filtró en bolsas Ankom® Technologies F57 (a peso constante), con la ayuda de un sistema de filtración conectado a una bomba de vacío. Las botellas se enjuagaron con agua caliente tres veces para asegurar la recuperación de todo el residuo de fermentación. Las bolsas se secaron a continuación en un horno de aire forzado ajustado a 55°C durante 48 h. La degradación de la materia seca se calculó por diferencia entre el peso inicial del sustrato seco y el peso del residuo seco.

Después de la medición del pH y filtración, se obtuvieron 4 ml del medio con una jeringa y se mezclaron con 1 ml de ácido metafosfórico al 25%, se agitaron ligeramente y se colocaron en un congelador hasta el análisis de la concentración de amoníaco-N. Se mezclaron otros 4 ml del medio con 1 ml de formaldehído al 10% y se agitaron ligeramente y luego se pusieron en un refrigerador a 4°C hasta el análisis del recuento bacteriano y protozoario.

Total de bacterias y protozoarios

La concentración de bacterias totales se determinó después de 48 h de incubación usando una bacteria de cámara de conteo Petroff-Hausser (Hausser Scientific®, 3900, Horsham, PA) y un microscopio de contraste de fase (Olympus®, BX51, Ciudad de México, México) De 100x. Se tomaron

exactamente 0,5 ml de la muestra de medio fijado al 10% de formaldehído y se diluyó en 4,5 ml de agua destilada. La concentración de bacterias por ml se determinó como el promedio de bacterias observadas en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de dilución y el factor de cámara (2×10^7), de acuerdo con la siguiente fórmula: Número bacteriano / mL = $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$.

Donde: μ es el promedio de bacterias en cada cuadrícula por tratamiento, FD1 es el primer factor de dilución (1.25) y FD2 es el segundo factor de dilución (10).

Para el recuento de protozoos, se obtuvo 1 ml de la muestra fija de formaldehído al 10% y se diluyó en 1 ml de agua destilada, luego se tomaron 0,5 ml de la mezcla con una pipeta Pasteur (BRAND, 7712, Wertheim, Alemania) y se depositó en una Neubauer (BRAND, 7178-10, Wertheim, Alemania), observada posteriormente en un microscopio de contraste (Carl Zeiss®, Axiostar, Ciudad de México, México) con un aumento de 400x. El recuento de protozoos se realizó en ocho cuadrantes (4 de cada cuadrícula), tomando como protozoos viables los que mantuvieron su integridad morfológica. La concentración de protozoos por ml de medio de cultivo se estimó como el promedio de protozoos observados en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de dilución y el factor de cámara (1×10^4), según la fórmula: Número de protozoos = $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 10^4$

Donde: μ es el número medio de protozoos en cada cuadrícula por tratamiento, FD1 es el primer factor de dilución (5) y FD2 es el segundo factor de dilución (3).

Análisis químicos

Se analizaron muestras de dieta balanceada y microalgas para DM (# 934.01), ceniza (# 942.05), nitrógeno (# 954.01) y extracto etéreo (# 920.39) según AOAC (1997). Se analizaron las dieta balanceada para FDA (Van Soest et al., 1991), FDA y lignina (AOAC, 1997; # 973.18) usando una Unidad de Analizador

de Fibra ANKOM200 (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, EE.UU.) con el uso de un Alfa amilasa y sulfito de sodio.

Los ácidos grasos (método ID: GB 5413.27-2010) y los aminoácidos (método de análisis ID: GB / T 5009 • 124-2003) de SMA se determinaron según los métodos estándar nacionales chinos (National Standards of People Republic of China 2010) Análisis proporcionado por el fabricante. Las muestras de SFO se analizaron para el contenido de ácidos grasos de acuerdo con el método de AOAC (1997) utilizando ésteres metílicos de ácidos grasos preparados por metanolisis catalizada por bases de los glicéridos. Los ácidos grasos se separaron en un cromatógrafo Perkin-Elmer (modelo 8420, Beaconsfield, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) equipado con un detector de ionización de llama. El helio fue el gas portador a 30cm / s y la temperatura de la columna fue inicialmente de 150°C durante 1min, y luego aumentada en 4°C / min a 200°C, y luego se mantuvo a 200 ° C durante 10 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos individuales se identificaron por tiempo de retención con referencia a los estándares de ésteres metílicos.

La concentración de N amoniacal ruminal se determinó según el método de Broderick y Kang (1980). La muestra del medio de incubación se centrifugó a 3000 xg durante 10 min y se mezclaron 20 µl del sobrenadante con 1 ml de fenol y 1 ml de hipoclorito y la mezcla se incubó a 39°C durante 30 minutos y después se diluyó con 5 ml De agua destilada. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible (Varian, modelo Cary 1E, California, EE.UU.) a 630 nm. La concentración mg / dL resultante se dividió por el factor 0.8, que es el factor de dilución de ácido metafosfórico al 25%.

Cálculos

Para la estimación de PG cinética, los volúmenes de gas (ml / g MS) se ajustaron mediante el procedimiento NLIN de SAS (2002) de acuerdo con France et al. (2000) modelo como:

$$(1) y = b \times [1 - e^{-c(t - \text{Lag})}]$$

Donde y es el volumen de GP en el tiempo t (h); B es la PG asintótica (ml / g de MS); C es la velocidad fraccionaria de fermentación (/ h), y L (h) es el tiempo de retardo discreto antes de que se libere cualquier gas.

La energía metabolizable (EM, MJ / kg MS) y la digestibilidad in vitro de la materia orgánica (MOD, g / kg MS) se estimaron de acuerdo con Menke et al. (1979) como:

$$(2) EM = 2.20 + 0.136 PG \text{ (ml / 0.5 g MS)} + 0.057 PC \text{ (g / kg de MS)}$$

$$(3) MOD = 148.8 + 8.89 PG + 4.5 PC \text{ (g / kg MS)} + 0.651 \text{ cenizas (g / kg MS)}$$

Donde PG es neto PG en ml de 200 mg de muestra seca después de 24h de incubación.

Se calculó el factor de reparto a las 24 h de incubación (PF24, una medida de la eficacia de fermentación) como la relación de la degradabilidad de la MS in vitro (mg) al volumen (ml) de PG a las 24 h (es decir, MSD / PG total PG24)) Según Blümmel et al. (1997). El rendimiento de gas (GY24) se calculó como el volumen de gas (ml de gas / g de MS) producido después de 24 h de incubación dividido por la cantidad de MSD (g) como:

$$(4) GY24 = \text{ml de gas / g de DM / g de MSD}$$

Las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se calcularon de acuerdo con Getachew et al. (2002) como:

$$(5) AGCC \text{ (mmol / 200 mg MS)} = 0.0222 PG - 0.00425$$

Donde GP es el PG neto de 24 h (mL / 200 mg de MS).

Se calculó la producción de biomasa microbiana (MCP) (Blümmel et al., 1997) como:

$$(6) MCP \text{ (mg / g de MS)} = \text{Milligramas MSD} - (\text{Gas mililitro} \times 2.2 \text{ mg / ml})$$

Donde el 2.2 mg / mL es un factor estequiométrico que expresa mg de C, H y O requeridos para el gas AGCC asociado con la producción de 1 mL de gas (Blümmel et al., 1997).

Análisis estadístico

Los datos de cada una de las tres series dentro de la misma muestra de cada una de las tres muestras individuales de raciones se promediaron antes del análisis estadístico y los valores medios para cada muestra individual utilizada como unidad experimental. El diseño experimental fue un diseño factorial 3×4 con 3 repeticiones en un diseño de bloques completos al azar. Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM (SAS, 2002) utilizando el modelo: $Y_{ijkl} = \mu + A_i + R_j + D_k + (A \times R)_{ij} + (A \times R \times D)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$ donde: Y_{ijkl} es la observación, μ es el promedio general, $(A \times R)_{ij}$ es la interacción entre el tipo de aditivo y la fuente del inóculo, $(A \times R \times D)_{ijk}$ Es la interacción entre el tipo aditivo, la fuente del inóculo y la dosis aditiva, y ϵ_{ijkl} es el error residual. La prueba de Tukey se usó para separar los medios.

REFERENCIAS

- Belenguer, A, Osoro, K, Hervás, G, Toral, P.G, Celaya, R, García, U, Frutos, P. Estructura de las comunidades bacterianas del rumen de vacas, ovejas y cabras en pastoreo. AIDA (2011), XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II, 830-832
- Galindo, Juana; Marrero, Yoandra; González, Niurca y Areadne Sosa. 2006. Libro en versión electrónica: Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Grenet, E.; A. Breton; P. Barry and P. Fonty. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonization as affected by diet composition. Anim. Feed Sci. Technol., 26: 55-70.
- Hébraud, M. y M. Fèvre. 1988. Characterization of glycosides and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromyces communis*. J. Gen. Microbiol. , 134: 1123-1129.
- Hespell, R.B. 1979. Efficiency of growth by ruminal bacteria. Feed Proc. 38: 2702.
- Hungate, R.E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academy Press Inc., New York.
- Joblin, K. N. y G. E. Naylor. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. FEMS Microbiology Letters , 65:111-122.
- Jouany, J. P. y K. Ushida. 1994. Plant cell-wall degradation by rumen protozoa. En: Microorganisms in ruminant nutrition . R.A. Prins y C.S. Stewart (eds.), Nottingham University Press, Nottingham. pp. 69-78.
- Nava Cuellar, Cuauhtémoc; Díaz Cruz, Antonio. 2001. Introducción a la digestión ruminal. Disponible en: <http://www.Produccionovina.com.ar/informacion-tecnica/> En línea: Julio. Consultada: Agosto 2007.
- Redondo, P. A., 2003. Anatomía del aparato digestivo de un rumiante. Disponible en: <http://www.inea.uva.es>. En línea: abril. Consultado: Agosto 2007.

ANEXO 1 ARTÍCULO

Influence the sunflower oil and *Schizochytrium microalgae* on ruminal methane and carbon dioxide emissions in goats

Short title: *Feed additives affect diet nutritive value.*

Abstract

The sustainable mitigation of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) emissions as well as ruminal fermentation kinetics of a total mixed ration (TMR) in the presence of *Schizochytrium microalgae* (SMA) and sunflower oil (SFO) or their mixture (1:1 dry matter (DM) basis; SASO) as unsaturated fatty acid sources was investigated. The TMR contained 218 g crude protein, 219 g neutral detergent fiber. All the additives were tested at (/g DM substrate): 0, 10, 20, 30, 40, and 50 mg. Rumen liquor from two Creole goat were used as inoculum. Additives affected ($P<0.05$) the fermentation kinetics in a dose-dependent manner. The inclusion of SFO at 1, 2, 4, and 5%, SMA at 2, 3 and 5%, and SASO at 1 and 3% increased ($P<0.01$) gas production (GP) and decreased ($P<0.05$) the rate of GP. All levels of SMA and SASO decreased the asymptotic GP and increased the rate of GP. Methane decreased CH₄ at all doses of SFO, at 1 and 4% of SMA and at 2, 4 and 5% of SASO. For both inoculum sources, additives at all doses decreased ($P<0.05$) fermentation pH, protozoal counts, and increased ammonia-N ($P<0.01$), DM degradability ($P<0.05$) and total bacterial counts ($P<0.01$). The feed additives can be used to improve feed utilization, and to reduce GHG production. Sunflower oil at 1 to 3%, SA at 1 to 2%, and SASO at 1 to 2% were the most efficacious in the nutrition of goats. *Schizochytrium microalgae* and sunflower oil could be a valuable means of sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions and improvement of the environmental conditions.

Keywords: greenhouse gases, in vitro fermentation, microalgae, sunflower oil.

1. Introduction

Livestock production contributes with about 18% of methane (CH₄) emission and 9% of carbon dioxide (CO₂) production, which have been implicated in causing climate change. Methane, CO₂, hydrogen (H₂) are the main gases produced during ruminal fermentation, causing a loss of 2 to 12% of dietary energy in ruminants (Johnson and Johnson, 1995). Improving feed utilization and animal performance is the main goal for nutritionists; however, social and environmental obligations to reduce greenhouse gas (GHG) emissions should be considered. Nutritional strategies including yeast (Elghandour et al., 2017), organic acids salt (Elghandour et al., 2016), exogenous enzymes (Kholif et al., 2017b), and essential oils (Hernandez et al., 2017b) have been used to control the production of ruminal methane from ruminants.

The inclusion of lipids in the diets of ruminant is thought to be a good strategy to reduce GHG production from ruminants (Hook et al., 2010), through the reduction of ruminal protozoal (Abubaker et al., 2013) concentrations in the rumen. Moreover, the inclusion of dietary lipids rich in docosahexaenoic acid (DHA) can enhance the nutritive value of the end product of ruminant production (e.g., milk and meat), and improve animal performance (Kholif et al., 2016). Docosahexaenoic acid is a ω -3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) that can be used as a strategy to enrich milk and meat with the DHA fatty acids, which have several beneficial effects on human health. Vegetable oils and microalgae are rich sources of unsaturated fatty acids (UFA) including DHA and conjugated linoleic acid (CLA) fatty acids.

Addition of vegetable oils to the rations of lactating animals is a strategy to alter the proportion of saturated (SFA) and UFA in animal products through the extensive

ruminal biohydrogenation (Kholif et al., 2016). Sunflower oil (SFO) is a rich source of in linoleic acid, and may increase CLA in the animal product (Morsy et al., 2015). Morsy et al. (2015) and Kholif et al. (2016) observed that feeding vegetable oils to lactating goats modified the fatty acid profile without negative effects in ruminal fermentation or nutrients digestibility.

Microalgae (*Schizochytrium* spp.) is a microalgae rich in dietary fatty acids and protein contents making it as a suitable feed supplement to improve feed utilization and productive performance (Burnett et al., 2017). *Schizochytrium* microalgae is a rich source of long-chain PUFA including DHA and eicosapentaenoic acid (EPA), therefore, it can be used to inhibit the in vitro biohydrogenation of fatty acids, resulting in reduction in the amount of SFA and an increase in UFA (Boeckert et al., 2007). *Schizochytrium* microalgae have also been shown to increase DHA concentration in milk of dairy animals (Moate et al. 2013). Similar to oils, some awareness about the negative effects of high inclusion levels of microalgae should be considered, because the high levels may reduce feed intake and fiber digestion (Burnett et al., 2017).

Different ruminant species have different comparative ability to digest feeds (Aderinboye et al., 2016). Therefore, examining the probable differences in the fermentative capacity of the microbial populations in goats offered the same diet and fermentation conditions is important. The present experiment aimed to study the effect of including SFO and/or SMA as UFA sources on in vitro ruminal fermentation and the sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions, as a mean for improving the environmental conditions, using rumen inoculums from goats fed the same diet. The hypothesis was that differences among ruminant species and different sources of dietary

fats will alter ruminal microflora making some changes in the ruminal microflora, resulting in improved dietary nutritive value and decreased GHG production.

2. Materials and methods

2.1. Substrate and treatments

A total mixed ration (TMR) was prepared as a substrate to contain (/kg DM) 400 g alfalfa hay (*Medicago sativa*), 250 g crushed yellow corn, 250 g soybean meal, and 100 g wheat bran. The chemical composition of the TMR was (/kg DM): 880 g DM (wet weight basis), 934 g organic matter (OM), 218 g crude protein (CP), 219 g neutral detergent fiber (NDF), and 201 g acid detergent fiber (ADF). The TMR without additive was considered as a control treatment. *Schizochytrium* microalgae (Xuhuang Bio-Tech Co., Ltd., Shaanxi, China) and SFO from a local supplier, were individually or their mixture at 1:1 DM basis (SASO) added to the TMR at levels of 1, 2, 3, 4, and 5% on DM basis. The chemical composition of the SMA is shown in Table 1. The individual fatty acids (g/100 g total fatty acids) of the oil were: 5.4 g, C16:0; 4.6 g, C18:0; 21.0 g, C18:1 and 69.0 g, C18:2.

2.2. In vitro fermentation and biodegradation

The inoculum was collected from two rumen cannulated Creole goat (50±2 kg body weight), housed in individual pens and fed a diet consisting of oat hay and concentrate (PURINA[®], Toluca, Mexico) at 60:40 ratio *ad libitum*, with free access to water. Animals were fed twice daily at 08:00 and 16:00 h, and managed under the

conditions stipulated in the Official Mexican Standard of technical specifications for the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Rumen contents were placed in a plastic thermos preheated at 39°C, and transport to the laboratory where it was flushed with CO₂, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a flask with O₂-free headspace. The rumen content was maintained at a temperature of 39°C with a continuous flow of CO₂.

Before the incubation process, the incubation medium containing buffer, macromineral, micromineral and resazurin solutions and distilled water were prepared according to Goering and Van Soest (1970) and mixed in a volumetric flask using a plate and magnetic stirrer set at 39 C to maintain the temperature and homogenize the solution. Consequently, the ruminal inoculum and the reducing solution were mixed at the ratio 1:4 vol/vol, respectively.

Samples (0.5 g) of the substrate were weighed into 120 mL serum bottles with appropriate addition of the additives (i.e., SMA, SFO or a mixture of SMA and SFO)/g DM. Consequently, 50 mL of previously prepared rumen liquor and the buffer were added. Bottles were maintained at constant CO₂ flow for 30 sec, and then capped with neoprene plugs and then sealed with aluminum rings. The vials were placed in an incubator (Riossa[®], F-51 D, Mexico State, Mexico) at 39°C for 48 h. Additionally, three bottles as blanks (rumen fluid only) were incubated for 48 h. Three incubation runs were performed in three weeks.

The readings of GP were performed at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 h of incubation. A water displacement apparatus was used according to Fedorak. The apparatus was designed with a universal support, with a conical funnel, a 100 mL

burette and two latex hoses of 0.5 and 1 m in length and 3/8-inch diameter. The vials were punctured with a 16-gauge needle placed at the end of the hose and the volume of GP (mL) was measured by the displacement of water in the burette.

After 48 h of incubation, 5 ml of gas were taken and stored in vials with saturated saline solution prepared with 400 g of NaCl in 1 L of distilled water and the pH adjusted to 2 and 5 mL of 20% methyl orange was added as indicator for CH₄ and CO₂ concentration determinations. The previously prepared saturated saline solution was stored in 60 mL serological vials without headspace and neoprene plugs placed and sealed with aluminum rings, and stored away from light. For the determination of CH₄ and CO₂, a sample of 10 µL of the gas phase was taken from the vials with saturated saline and injected into a PerkinElmer, Claurus 500 gas chromatograph (Mexico City, Mexico) with a flame ionization detection and helium as the carrier gas. A thermal conductivity detector was used with the oven, column and TCD temperatures set at 80° C, 170° C and 130° C, respectively. Retention times were 0.73 min and 1.05 min for CH₄ and CO₂, respectively.

At the end of incubation at 48 h, the fermentation process was stopped by swirling the bottles in ice for 5 minutes, then the bottles were uncapped and the pH was measured immediately using a pH meter (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, USA). The contents of the bottles were filtered in to Ankom® Technologies F57 bags (at constant weight), with the aid of a filtration system connected to a vacuum pump. The bottles were rinsed with hot water three times to ensure recovery of all the residue of fermentation. The bags were then dried in a forced

air oven set at 55° C for 48 h. Dry matter degradation was calculated by difference between the initial weight of the dried substrate and the weight of the dried residue.

After the pH measurement and filtration, 4 mL of the medium was obtained using a syringe and mixed with 1 mL of 25% metaphosphoric acid, shaken slightly and placed in a freezer until analysis of ammonia-N concentration. Another 4 mL of the medium was mixed with 1 mL of 10% formaldehyde and shaken slightly then placed in a refrigerator at 4° C until analysis of bacterial and protozoal count.

2.3. Total bacteria and protozoa count

The concentration of total bacteria was determined after 48 h of incubation using a count chamber bacterium Petroff-Hausser (Hausser Scientific[®], 3900, Horsham, PA) and a phase contrast microscope (Olympus[®], BX51, Mexico City, Mexico) at a magnification of 100x. Exactly 0.5 mL of the 10% formaldehyde fixed medium sample was taken and diluted in 4.5 mL of distilled water. The concentration of bacteria per mL was determined as the average of bacteria observed in each grid, multiplied by the dilution factor and the chamber factor (2×10^7), according to the following formula:

$$\text{Bacterial number/mL} = \mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$$

Where: μ is the average of bacteria in each grid per treatment, FD1 is the first dilution factor (1.25) and FD2 is the second dilution factor (10).

For the protozoal count, 1 mL of the 10% formaldehyde fixed sample was obtained and diluted in 1 mL of distilled water, then 0.5 mL of the mixture was taken with a Pasteur pipette (BRAND, 7712, Wertheim, Germany) and deposited into a

Neubauer chamber (BRAND, 7178-10, Wertheim, Germany), subsequently observed on a contrast microscope (Carl Zeiss®, Axiostar, Mexico City, Mexico) at 400x magnification. The protozoa count was made in eight quadrants (4 of each grid), taking as viable protozoa those that maintained their morphological integrity. The concentration of protozoa per mL of culture medium was estimated as the average of protozoa observed in each grid, multiplied by the dilution factor and the chamber factor (1×10^4), according to the formula: Protozoal number = $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 10^4$

Where: μ is the average number of protozoa in each grid per treatment, FD1 is the first dilution factor (5), and FD2 is the second dilution factor (3).

2.4. Chemical analyses

Samples of the TMR and microalgae were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), nitrogen (#954.01) and ether extract (#920.39) according to AOAC (1997). The TMR were analyzed for NDF (Van Soest et al., 1991), ADF and lignin (AOAC, 1997; #973.18) using an ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) with the use of an alpha amylase and sodium sulfite.

The fatty acids (method ID: GB 5413.27–2010) and amino acids (analysis method ID: GB/ T 5009.124-2003) of SMA was determined according to the Chinese national standard methods analysis (National Standards of People's Republic of China 2010) as provided by the manufacturer. Samples of SFO were analyzed for fatty acids content according to the method of AOAC (1997) using fatty acids methyl esters prepared by base-catalyzed methanolysis of the glycerides. The fatty acids were separated on a

Perkin-Elmer chromatograph (model 8420, Beaconsfield, Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) equipped with a flame ionization detector. Helium was the carrier gas at 30 cm/sec and column temperature was initially 150°C for 1 min, and then increased by 4°C/min to 200°C, and was then held at 200°C for 10 min. Individual fatty acids methyl esters were identified by retention time with reference to methyl esters standards.

The concentration of ruminal ammonia-N was determined according to Broderick, G.A., Kang, J.H., 1980 method. Sample of the incubation medium were centrifuged at 3000×g for 10 min, and 20 µl of the supernatant was mixed with 1 mL of phenol and 1 mL of hypochlorite and the mixture incubated at 39°C for 30 min and thereafter diluted with 5 mL of distilled water. Samples were read on a visible ultraviolet light spectrophotometer (Varian, model Cary 1E, California, USA) at 630 nm. The resulting mg/dL concentration was divided by the factor 0.8, which is the 25% metaphosphoric acid dilution factor.

2.4. Calculations

For the estimation of GP kinetic, gas volumes (mL/g DM) were fitted using the NLIN procedure of SAS (2002) according to France et al. (2000) model as:

$$(1) y = b \times [1 - e^{-c(t-Lag)}]$$

where y is the volume of GP at time t (h); b is the asymptotic GP (mL/g DM); c is the fractional rate of fermentation (/h), and L (h) is the discrete lag time prior to any gas is released.

Metabolizable energy (ME, MJ/kg DM) and in vitro organic matter digestibility (OMD, g/kg DM) were estimated according to Menke et al. (1979) as:

$$(2) \text{ ME} = 2.20 + 0.136 \text{ GP (mL/0.5 g DM)} + 0.057 \text{ CP (g/kg DM)}$$

$$(3) \text{ OMD} = 148.8 + 8.89 \text{ GP} + 4.5 \text{ CP (g/kg DM)} + 0.651 \text{ ash (g/kg DM)}$$

where GP is net GP in mL from 200 mg of dry sample after 24 h of incubation.

The partitioning factor at 24 h of incubation (PF₂₄; a measure of fermentation efficiency) was calculated as the ratio of DM degradability in vitro (mg) to the volume (mL) of GP at 24 h (i.e., DMD/total GP (GP₂₄)) according to Blümmel et al. (1997). Gas yield (GY₂₄) was calculated as the volume of gas (mL gas/g DM) produced after 24 h of incubation divided by the amount of DMD (g) as:

$$(4) \text{ GY}_{24} = \text{mL gas/g DM/g DMD}$$

Short chain fatty acid concentrations (SCFA) were calculated according to Getachew et al. (2002) as:

$$(5) \text{ SCFA (mmol/200 mg DM)} = 0.0222 \text{ GP} - 0.00425$$

where GP is the 24 h net GP (mL/200 mg DM).

Microbial biomass production (MCP) was calculated (Blümmel et al., 1997) as:

$$(6) \text{ MCP (mg/g DM)} = \text{Milligrams DMD} - (\text{Milliliter gas} \times 2.2 \text{ mg/mL})$$

where the 2.2 mg/mL is a stoichiometric factor that expresses mg of C, H and O required for the SCFA gas associated with production of 1 mL of gas (Blümmel et al., 1997).

2.5. Statistical analyses

Data of each of the three runs within the same sample of each of the three individual samples of rations were averaged prior to statistical analysis and the mean values for each individual sample used as the experimental unit. The experimental design was a 3×4 factorial design with 3 replicates in a randomized complete block design. Data were analyzed using the GLM procedure (SAS, 2002) using the model: $Y_{ijkl} = \mu + A_i + D_j + (A \times D)_{ij} + \epsilon_{ijk}$ where: Y_{ijk} is the observation, μ is the population mean, A_i is the additive type effect, D_j is the additive dose effect, $(A \times D)_{ij}$ is the interaction between additive type, and additive dose, and ϵ_{ijk} is the residual error. Tukey test was used to separate means.

3. Results

3.1. Gases production

Fig. 1 shows the *in vitro* GP of the incubated substrate with the different additives and inoculum from goats (Table 2). The rates of GP, CH₄ and CO₂ production expressed as mL/g degraded DM were differed between the inoculum. Besides, additive types ($P < 0.001$) and additive doses affected GP, CH₄ and CO₂ production (quadratic effect, $P < 0.001$). The goat inoculum at levels 1, 2, 4, and 5% of SFO, the doses 2, 3 and 5% of SMA and the doses 1 and 3% of SASO increased (linear and quadratic effects, $P < 0.001$) the asymptotic GP, and GP (mL/g degraded DM) and decreased (linear and quadratic effects, $P < 0.05$) the rate of GP compared with the control treatment.

At the levels 3% of SFO, 1 and 4% of SMA, and 2, 4 and 5% of SASO decreased CH₄ production as mL/g DM incubated substrate (linear and quadratic effect, $P \leq 0.008$) while the other levels of additives increased CH₄ production (Table 2). All doses of SFO decreased (linear and quadratic effects, $P \leq 0.005$) proportional CH₄ production, and increased proportional CO₂ production.

3.2. Ruminal bacteria and protozoa

All doses quadratically decreased ($P=0.003$) total protozoal counts and linearly increased ($P=0.002$) total bacterial counts (Table 3).

3.3. Fermentation kinetics

All doses decreased (linear and quadratic effects, $P < 0.001$) fermentation pH and increased ammonia-N ($P < 0.001$), and DMD ($P < 0.05$). The levels 1, 2, 4 and 5% of SFO, levels 2, 3 and 5% of SMA and the levels 1 and 3% of SASO increased (linear and quadratic effects, $P \leq 0.001$) SCFA, OMD, ME, GY₂₄, and MCP but decreased PF₂₄ (Table 3).

Table 1The chemical composition of *Schizochytrium* microalgae.

Nutrients	g/kg DM
Proximate composition	
Dry matter	950
Organic matter	880
Crude fat	470
Crude protein	120
Carbohydrates	180
Crude fiber	50
Fatty acids profile	
C14:0	81
C16:0	256
C20:4 ARA	23
C20:5 EPA	23
C22:5 DPA	168
C22:6 DHA	400
Others	49
Amino acids profile	
Alanine	54
Arginine	90
Aspartic acid	94
Cystine	15
Glutamic acid	270
Glycine	44
Histidine	16
Isoleucine	27
Leucine	52
Lysine	32
Methionine	17
Phenylalanine	32
Proline	35
Serine	43
Threonine	40
Tyrosine	21
Valine	57
Others	61

Table 2

In vitro biogas production (mL/g DM) of a total mixed ration as affected by the addition of sunflower oil, *Schizochytrium* microalgae or their mixture at 1:1 DM basis using rumen liquor from goats

Additive	Dose	Gas production parameters ¹				CH ₄ production at 48 h of incubation			CO ₂ production at 48 h of incubation		
		<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	mL gas/g degraded DM	CH ₄ production	Proportional CH ₄ production	mL CH ₄ /g degraded DM	CO ₂ production	Proportional CO ₂ production	mL CO ₂ /g degraded DM
Control	0	192	0.125	2.31	288	170	89.0	257	21.1	11.0	31.8
Sunflower oil	1	273	0.099	1.87	360	232	85.8	309	38.4	14.2	51.2
	2	267	0.104	2.15	355	223	84.1	299	42.2	15.9	56.6
	3	162	0.215	2.14	215	135	83.5	180	26.8	16.5	35.5
	4	296	0.095	1.31	388	248	84.9	329	44.5	15.1	59.0
	5	278	0.106	2.04	363	224	80.9	294	52.9	19.1	69.4
<i>Schizochytrium</i> microalgae	1	154	0.214	2.44	198	132	85.5	170	22.4	14.5	28.8
	2	277	0.100	2.10	353	236	86.0	304	38.5	14.0	49.5
	3	270	0.111	1.98	359	231	86.1	309	37.4	13.9	50.0
	4	163	0.223	2.84	213	143	87.8	187	19.8	12.2	26.0
	5	248	0.114	2.08	328	212	85.6	281	35.6	14.4	47.1
Sunflower + <i>Schizochytrium</i> microalgae	1	265	0.108	1.96	349	232	88.3	308	31.0	11.8	41.0
	2	152	0.222	2.29	202	132	86.6	175	20.4	13.4	27.0
	3	260	0.101	1.96	338	224	87.0	294	33.7	13.0	44.0
	4	165	0.197	2.12	220	143	86.3	190	22.7	13.7	30.2
	5	144	0.224	2.74	193	125	87.0	168	18.7	13.0	25.2
SEM		4.5	0.0039	0.148	7.5	4.5	1.07	7.3	2.71	1.07	3.63
Additive		<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.538	<0.001	0.004	0.547	0.004
Linear		<0.001	<0.001	0.299	0.018	<0.001	0.001	0.008	0.892	0.001	0.033
Quadratic		<0.001	0.022	0.148	0.229	<0.001	0.005	0.016	0.168	0.006	0.015

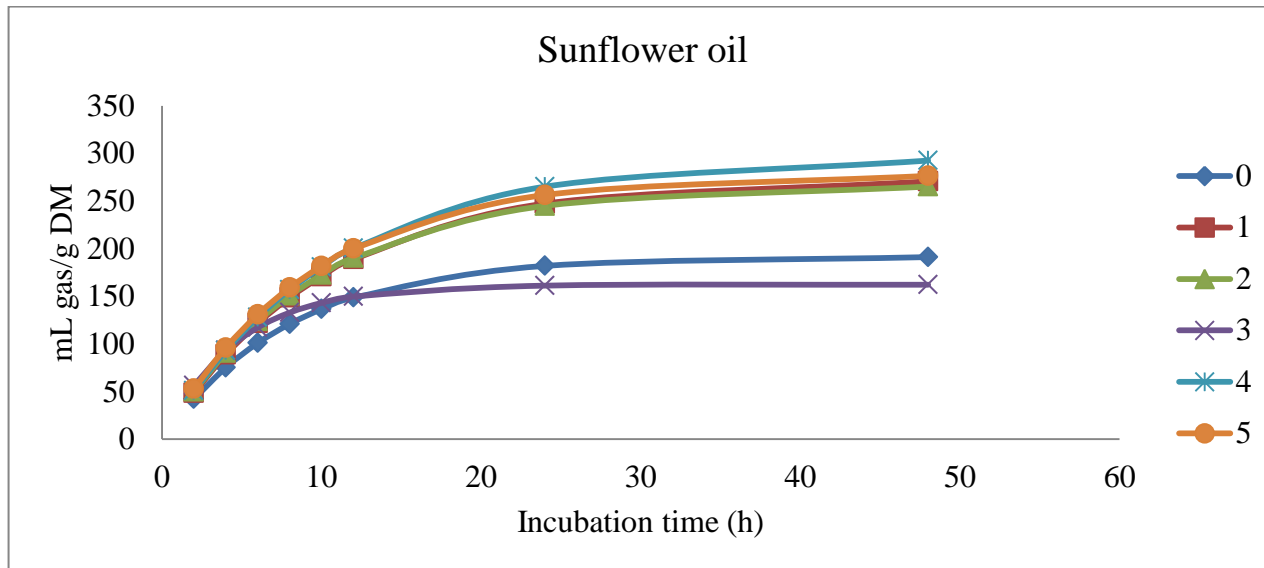
¹*b* is the asymptotic gas production (mL/g DM); *c* is the rate of gas production (/h); *Lag* is the initial delay before gas production begins (h)

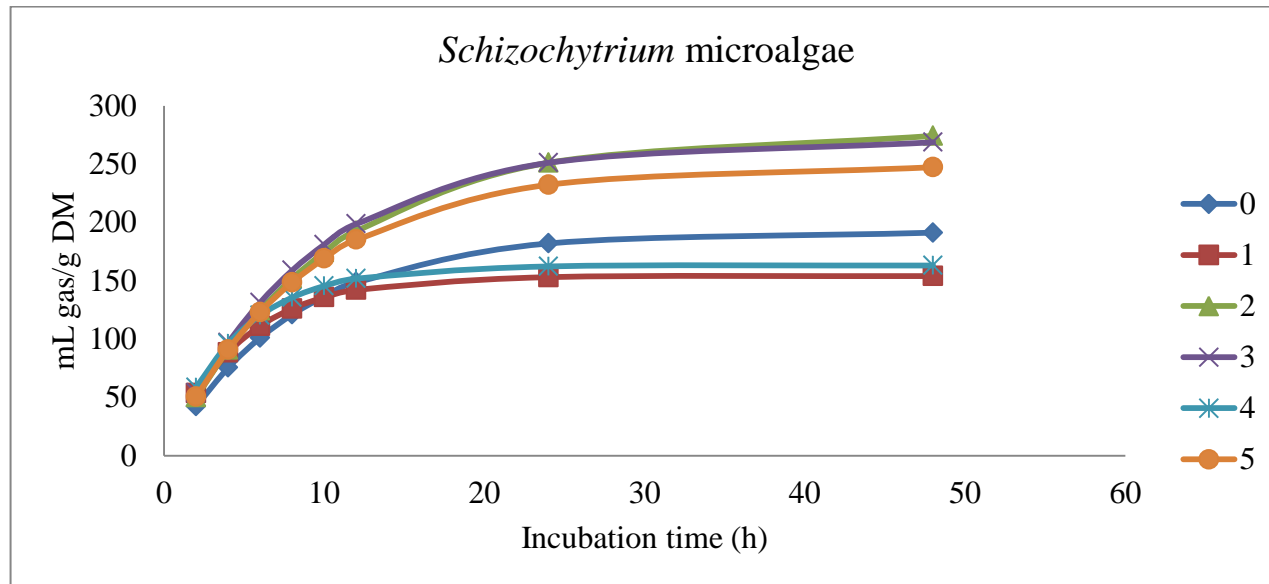
Table 3

Fermentation kinetics¹ of a total mixed ration as affected by the addition of sunflower oil, *Schizochytrium* microalgae or their mixture at 1:1 DM basis using rumen liquor from goats and steers

Additive	Dose	pH	SCFA	Ammonia-N	DMD	OMD	ME	PF ₂₄	GY ₂₄	MCP	Total bacteria × 10 ⁸	Total protozoa × 10 ⁵
Control	0	6.91	4.02	55.7	664	575	8.39	5.59	179	616	4.88	6.82
Sunflower oil	1	6.49	5.47	66.4	753	691	10.17	5.18	193	739	9.73	4.36
	2	6.49	5.42	61.9	747	687	10.11	5.19	192	734	10.58	3.75
	3	6.44	3.56	60.3	755	538	7.83	5.78	173	578	11.97	3.09
	4	6.46	5.86	61.7	755	723	10.66	5.11	196	772	11.72	3.72
	5	6.46	5.67	61.6	762	707	10.42	5.14	194	756	9.60	4.49
<i>Schizochytrium</i> microalgae	1	6.45	3.38	61.5	776	524	7.61	5.88	170	562	4.98	4.39
	2	6.47	5.56	61.3	776	698	10.28	5.17	194	746	8.92	4.30
	3	6.47	5.55	60.4	749	698	10.28	5.17	193	746	8.95	3.74
	4	6.48	3.58	61.7	765	540	7.86	5.77	173	580	7.28	4.22
	5	6.48	5.14	69.7	754	664	9.76	5.26	190	711	9.48	4.13
Sunflower + <i>Schizochytrium</i> microalgae	1	6.46	5.41	56.3	755	686	10.10	5.20	192	734	9.05	3.78
	2	6.40	3.33	56.4	754	520	7.55	5.90	170	559	11.17	3.54
	3	6.48	5.24	58.7	764	673	9.89	5.23	191	719	12.55	3.81
	4	6.43	3.62	58.1	750	543	7.90	5.75	174	582	8.97	3.41
	5	6.38	3.16	60.1	744	506	7.34	6.01	167	544	10.30	3.79
SEM		0.009	0.091	0.91	9.9	7.3	0.111	0.038	1.1	7.6	1.626	0.661
Additive		<0.001	<0.001	<0.001	0.023	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.048
Linear		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.930	0.006
Quadratic		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.0005	<0.001	0.041	0.007

¹pH ruminal pH, DMD dry matter degradability (mg/g DM), SCFA short-chain fatty acids (mmol/g DM), GY₂₄ gas yield at 24 h (mL gas/g DMD), PF₂₄ partitioning factor at 24 h of incubation (mg DMD/mL gas), OMD in vitro organic matter digestibility (g/kg DM), ME metabolizable energy (MJ/kg DM), MCP microbial protein production (mg/g DM)





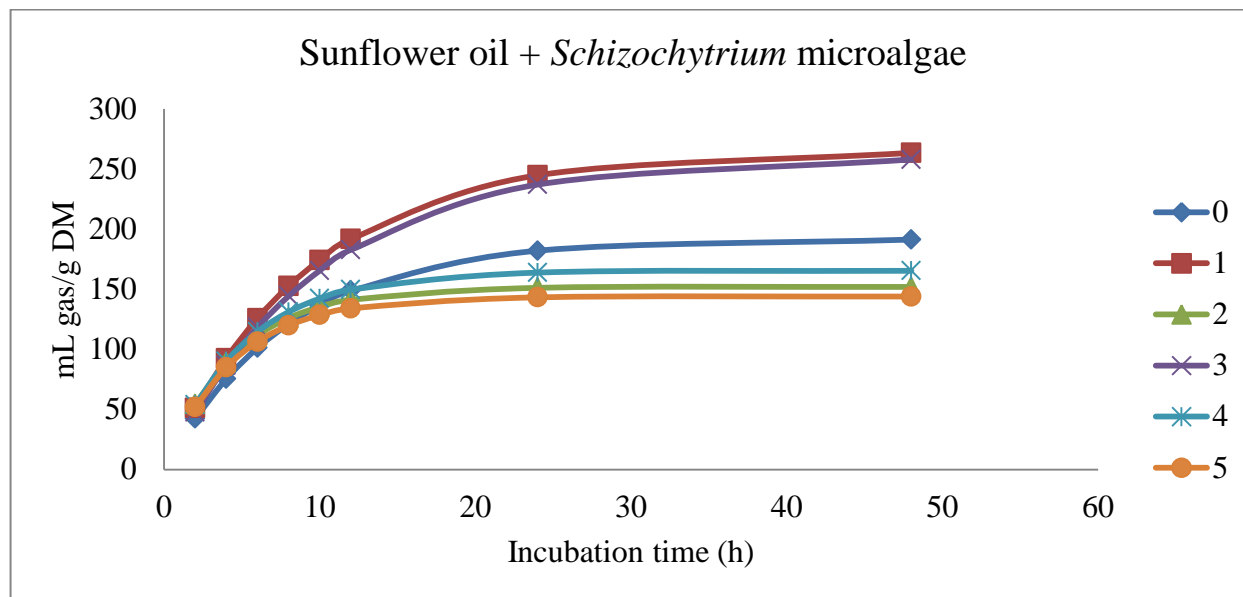


Fig 1.

In vitro gas production (mL/g incubated DM) of a total mixed ration incubated with inoculum from goats in the presence of sunflower oil, *Schizochytrium* microalgae or their mixture (1:1 DM basis) at five levels.

4. Discussion

4.1. Gas production

Using rumen fluid from different ruminant species to inoculate the in vitro incubation cultures is a useful tool to examine possible differences in the ruminal microbial population and the digestive capacity of each ruminant species. The lack of effect on asymptotic GP with cattle and goat inoculums in agreement with earlier works by Bueno et al. (1999) and Aderinboye et al. (2016) who reported similarity in the estimated total GP among inoculums collected from cattle, sheep and goats. Aderinboye et al. (2016) also reported different fermentation parameters among cows, sheep and goat's inoculums; with better fermentation with the inoculum of cattle compared to those measured with sheep and goat inoculums. In the present experiment, the rate of GP was higher for goat. In contrast, Aderinboye et al. (2016) observed higher rate of GP with cattle compared with goat inoculum, which may be due to the varied diets fed to rumen liquor donors. Cone et al. (2002) reported a well-correlated total GP from inoculum of sheep and cattle, but poor correlation of rates of GP with the two inoculums.

The results from the current study reveal that the inclusion of SFO up to 4 and 5% of the diet did not negatively affect ruminal fermentation. In agreement with results of the current study, Narimani-Rad et al. (2011) observed a positive effect with the inclusion SFO at 2.5% to a concentrate-based diet containing alfalfa forage and barley grain at 40:60, and a negative effect on GP at 5% of SFO inclusion. Furthermore, Narimani-Rad et al. (2012) observed lack of effect on GP or rate of GP with the inclusion of SFO at the same levels

with forage-based diets. This variation may be due to the different substrates used. Sunflower oil inclusion to a forage-based diet may coated feed particles and decreased attachment of ruminal microbes resulting in similar fermentation patterns (Narimani-Rad et al., 2012).

The in vitro results of micro-algae supplementation appear promising (Kholif et al., 2017b), however, further in vivo studies are required to elucidate the optimum dose in ruminants in terms of effects on feed nutritive value and CH₄ production. Because of the negative effect of SMA at most doses on measured parameters, only the negative effect on ruminal fermentation will be discussed. It is well documented that most species of microalgae contain some antioxidative, antimicrobial or compounds with cytotoxic effects (Scholz and Liebezeit, 2012), which may negatively affected GP. Besides, the contents of long chain fatty acids in SMA may have a negative effect on feed digestion and fermentation (Burnett et al., 2017). The negative effect of long chain fatty acids on ruminal fermentation was also reported by Beauchemin et al. (2007).

4.2. Greenhouse gas production

The different effects of rumen inoculum on CH₄ and fermentation parameters may be due to different bacterial and protozoal populations and microbial activity in goats (Aderinboye et al., 2016). Hook et al. (2010) reported that CH₄ production varies based on the ruminant species because the protozoal population varies from animal-to-animal despite the feeding of the same diets (Boeckaert et al., 2007). Because ruminal microbial

populations depend mainly on the type of diet fed, and since both of goats were maintained on the same diet, microbial species were not expected to vary (Mould et al., 2005). Mould et al. (2005) reported that other factors can make some variations in inoculum including host animal effects, sampling time and source, as well as sample preparation and inoculation. Besides, Ammar et al. (2004) reported that differences in dentition, chewing/eating behavior, gut physiology, compartment dimensions and retention time would influence gut microflora. Thus, variations in CH₄ production and fermentation kinetics in goat rumen fluid indicates that one species cannot be used to predict CH₄ production and fermentation profile of feeds (Bueno et al., 1999; Aderinboye et al., 2016), and wherever possible the inoculum should be obtained from an appropriate host animal.

Sustainable mitigating CH₄ emissions is not only environmentally beneficial, but would also increase feed energy-use efficiency in ruminants. Based on the energy balances reported by Bruinenberg et al. (2002) and Nkrumah et al. (2006), reducing CH₄ emission could potentially increase body weight gain of growing cattle by 75 g/d and milk production in dairy cows by approximately 1 L/d. The inclusion of dietary lipids is considered as one of the most effective strategy of depressing ruminal methanogenesis (Martin et al., 2010). However, although high levels of dietary lipids may reduce CH₄ production up to 40% (Jordan et al., 2006), increasing the level of dietary lipids beyond 8% can reduce feed intake. Therefore, the level of lipids in ruminant diets must be limited to 6-8% DM to avoid negative impacts on feed intake and fiber digestion and to reduce CH₄ production by up 10-25% (Beauchemin et al., 2008). In the present experiment, SFO, SMA and SASO decreased proportional CH₄. This result was expected based on the well-

documented theory that dietary lipids can be used as an option to reduce methanogenic archaea, due to their ability to inhibit ruminal protozoa (Hook et al., 2010). Diets high in UFA undergo ruminal biohydrogenation, which forms an alternative H₂ sink to methanogenesis (Johnson and Johnson, 1995). Reduction of H₂ accumulation in the rumen by addition of UFA seems to be a promising procedure to reduce rumen CH₄ production. Fatty acids can bind to the cell membrane and interrupt membrane transport (Dohme et al., 2001). Suppression of ruminal methanogenesis with dietary lipids depends mainly on the degree of unsaturation of the fatty acids, where sources rich in long chain fatty acids inhibit ruminal cellulolytic microbes to a greater degree than SCFA (Meale et al., 2012). This can explain the varied responses between SFO and SMA.

Microalgae with high concentrations of EPA and DHA fatty acids have been shown to shift ruminal fermentation towards increased propionate production and decreased CH₄ production (Johnson and Johnson, 1995). Fievez et al. (2007) reported a reduction on in vitro CH₄ production up to 80% with the addition of DHA-enriched microalgae.

The varied responses to SFO and SMA inclusion were expected because many factors including the ruminant species, experimental diet, and the type of lipid used account for varying effects of lipids on methane abatement (Hook et al., 2010). Beauchemin et al. (2007) reported 11.5-22.0% reduction in methanogenesis with the inclusion of SFO in the diet of cows.

4.3. Ruminal bacteria and protozoa

The lower protozoal counts with SFO and SMA can be explained based on the toxic effect of oils at high levels (Abubakr et al., 2013) and unsaturated C18 fatty acids (e.g., SFO; Newbold and Chamberlain, 1988) to rumen ciliate protozoa. High level of dietary lipid is toxic to rumen protozoa due to the limited ability of protozoa to absorb and transform lipids (Williams, 1989), resulting in rupture of the protozoa cells (Girard and Hawke, 1978). Protozoa has a low ability to perform ruminal fat biohydrogenation compared with bacteria, thus the inclusion of dietary lipids in the diet decreased the protozoal growth. Boeckaert et al. (2007) showed a decreased importance of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* and some species of *Epidinium caudatum* ciliates in the rumen of SMA-fed cows. Protozoa engulfs rumen bacteria cell up to 20,000 cells per hour (Dehority, 2003). This pronounced effect of protozoa on the bacterial activities in the rumen (Williams and Coleman, 2012); therefore, might explain the increased bacterial count with the inclusion of SFO, SMA, and SASO additives. Different effects on ruminal protozoa with different dietary fat sources have been reported (Wanapat and Khampa, 2006).

Sunflower oil and SMA increased total bacterial counts and MCP production suggesting an increase in the availability of energy for microbial growth. Boeckaert et al. (2007) observed that feeding SMA shifted ruminal bacteria toward cellulolytic population instead of amylolytic bacteria in the rumen of SMA-fed dairy cow. The decreased protozoa can be a reason for increased bacterial number because protozoa engulf rumen bacteria cell

up to 20,000 cells per hour (Dehority, 2003), therefore, bacterial cell number could be multiplied after protozoal decline.

4.4. Fermentation kinetics

The feed additives improved fermentation kinetics in a dose-dependent manner. Both of SFO and SMA decreased fermentation pH. However, the reported values of fermentation pH were within the range of 6.38 to 6.49, which is above the values that might negatively affected rumen function (de Veth, M.J., Kolver, E.S., 2001). The reported values indicate a normal ruminal fermentation environment for the culture medium. The lower ruminal pH may be related to the increased concentration of ammonia and total SCFA observed with the additive supplementation (Sucu et al., 2017), or due to increased energy density (Morsy et al., 2015) in the diets. The increased total SCFA production and decreased pH reflect a higher extent of fermentation with the inclusion of SFO and SMA. The greater SCFA and ME were a result of improved fermentation and OMD with the additives, and may be due to improved synchronization between energy and N release in the ruminal medium. Morsy et al. (2015) observed a decline in ruminal pH and an increase in SCFA concentration with the inclusion of SFO at 20 mL/d in the diet of goats.

Sunflower oil and SMA increased ammonia-N, which may be because of increased bacterial count with the inclusion of SFO and SMA, and with the presence of soybean meal as the main protein source in the TMR. The enhanced microbial activity and nutrients degradation due to increased total ruminal bacterial numbers, in response to the inclusion of

SFO and SMA in the diet is usually linked to an increase in SCFA production (Morsy et al., 2015; Sucu et al., 2017). Ueda et al. (2003) observed that the inclusion of flaxseed oil increased ruminal ammonia concentration in dairy cows due to increasing bacterial N flow with SFO.

Sunflower oil and SMA enhanced TMR degradability because of increasing total bacterial count and MCP production. Narimani-Rad et al. (2012) observed that the inclusion of SFO at 0, 2.5 or 5% of a forage-based diet did not affect ME, OMD, and net energy of diets. Sucu et al. (2017) observed that feeding lambs on diets supplemented with SMA at 5 g/d increased ruminal SCFA concentration and decreased rumen pH, without affecting ruminal ammonia-N concentration.

These improved fermentation kinetics as OMD, ME, GY_{24} , and MCP do not support the often stated superiority of goats over cattle in terms of nutrients digestibility (Domingue et al., 1991).

5. Conclusion

The tested feed additives can be used to improve feed utilization, and to reduce GHG production for sustainable livestock production and improvement of the environmental conditions. The best levels of feed additives were sunflower oil at 1 to 3%, *Schizochytrium* microalgae at 1 to 2%, and the mixture at 1 to 2%. The reduced diet's nutritive value with some levels, and increases with other levels, suggests it may be possible to prepare appropriate doses and mixtures of algae and sunflower oil to obtain both methane

reduction, and maintain or improve feed utilization. These observations imply that the in vitro evaluation of feeds using different inoculums could be recommended to examine differences between animal species. More research will be desirable to determine whether *Schizochytrium* microalgae and sunflower oil or their mixture could be used as feed additives for improving the environmental conditions, and affect feed utilization and methane production in dairy and beef cattle, goats.

Conflict of interest

All authors declare that there are no present or potential conflicts of interest among the authors and other people or organizations that could inappropriately bias their work.

Acknowledgements

Kholif, A.E. thanks the National Council for Science and Technology (CONACyT, Mexico) and The World Academy of Sciences (TWAS, Italy) for supporting his postdoctoral fellowship at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

References

- Abubakr, A.R., Alimon, A.R., Yaakub, H., Abdullah, N., Ivan, M., 2013. Digestibility, rumen protozoa, and ruminal fermentation in goats receiving dietary palm oil by-products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(2), 147-154.
- Aderinboye, R.Y., Akinlolu, A.O., Adeleke, M.A., Najeem, G.O., Ojo, V.O.A., Isah, O.A., Babayemi, O.J., 2016. In vitro gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocula. *Slovak Journal of Animal Science*, 49(1), 32-43.
- Ammar, H., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ovejero, F.J., Gonzalez, J.S. Lopez, S. 2004. Effect of inoculum source (sheep or goat rumen fluid) on in vitro digestibility and gas production kinetics of the foliage of some Spanish browse plants. *Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneenes. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneens, Montpellier, France*. 59, pp. 121–126.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* 48, 21-27.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Petit, H.V., 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Can. J. Anim. Sci.* 87(3), 431-440.

- Blümmel, M., Steingss, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77, 911–921.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., Fievez, V., 2007. In vitro examination of DHA-edible micro algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136(1), 63-79.
- Broderick, G.A., Kang, J.H., 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy Sci.* 63, 64–75.
- Bruinenberg, M.H., Van der Honing, Y., Agnew, R.E., Yan, T., Van Vuuren, A.M., Valk, H., 2002. Energy metabolism of dairy cows fed on grass. *Livest. Prod. Sci.* 75(2), 117-128.
- Bueno, I., Abdalla, A., Cabral Filho, S.L.S., Vitti, D., Owen, E., Mauricio, R., Givens, I., Sutton, J., Mould, F., 1999. Comparison of inocula from sheep and cattle for the in vitro gas production under tropical conditions. In: Annual Meeting of the British Society of Animal Science, 13, 151-156).
- Burnett, V.F., Jacobs, J.L., Norng, S., Ponnampalam, E.N., 2017. Feed intake, liveweight gain and carcass traits of lambs offered pelleted annual pasture hay supplemented with flaxseed (*Linum usitatissimum*) flakes or algae (*Schizochytrium sp.*). *Anim. Prod. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1071/AN15230>

- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., Lamberet, G., 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86(5), 1751-1770.
- Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Bachmann, H., 2000. Influence of inoculum source, dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. In: *Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity. Proceedings of the EAAP Satellite Symposium on Gas Production, Wageningen, The Netherlands. Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 15–16.
- de Veth, M.J., Kolver, E.S., 2001. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84 (9), 2066–2072.
- Dehority, B.A., 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, NG11 0AX, UK. 372 pp.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M., 2001. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Lett. Appl. Microbiol.* 32(1), 47-51.
- Domingue, B.F., Dellow, D.W., Wilson, P.R., Barry, T.N., 1991. Comparative digestion in deer, goats, and sheep. *New Zealand J. Agric. Res.* 34(1), 45-53.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A., 2016. Addressing sustainable ruminal methane

and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194–200.

Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Cipriano, M.M., Camacho, L.M., Márquez, O., 2017. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* 45:1, 389-395.

Fievez, V., C. Boeckart, B. Vlaeminck, J. Mestdagh, and D. Demeyer. 2007. In vitro examination of DHA-edible micro-algae: 2. Effect on rumen methane production and apparent degradability of hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 80-95.

Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *J. Agr. Sci., Cambridge.*, 139, 341–352.

Girard, V., Hawke, J.C., 1978. The role of holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. *Biochem. Biophys. Acta* 528, 17–27.

Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC.

Hook, S.E., Wright, A.D.G., McBride, B.W., 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 2010. Article ID 945785, 11 pages; doi:10.1155/2010/945785.

- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483-2492.
- Jordan, E., Lovett, D.K., Hawkins, M., Callan, J.J., O'Mara, F.P., 2006. The effect of varying levels of coconut oil on intake, digestibility and methane output from continental cross beef heifers. *J Anim. Sci.* 82(06), 859-865.
- Kholif, A., Morsy, T., Matloup, O., Anele, U., Mohamed, A., El-Sayed, A.B., 2017b. Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *J. Agr. Sci.* DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859616000824>.
- Kholif, A.E., Morsy, T.A., Abd El Tawab, A.M., Anele, U.Y., Galyean, M.L., 2016. Effect of supplementing diets of Anglo-Nubian goats with soybean and flaxseed oils on lactational performance. *J. Agric. Food Chem.* 64, 6163-6170.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.
- Meale, S.J., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., Harstad, O.M., Chaves, A.V., 2012. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock. *Acta Agric. Scand. Section A-Anim. Sci.* 62, 199-211.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding

- stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agr. Sci., Cambridge.*, 93, 217–222
- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Hannah, M.C., Eckard, R.J., Auldist, M.J., Ribaux, B.E., Jacobs, J.L., Wales, W.J., 2013. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 3177-3188.
- Morsy, T.A., Kholif, S.M., Kholif, A.E., Matloup, O.H., Salem, A.Z.M., Elella, A.A., 2015. Influence of sunflower whole seeds or oil on ruminal fermentation, milk production, composition, and fatty acid profile in lactating goats. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 28, 1116-1122.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 31-50.
- Narimani-Rad, M., Nahand, M.K., Shahryar, H.A., Maheri-Sis, N., Nobar, R.S., Lotfi, A., 2011. Influence of sunflower oil supplementation on in vitro gas production of mixed ration for ruminants. *Eur. J. Exp. Biol.* 1, 125-129
- Narimani-Rad, M., Shahryar, H.A., Nahand, M.K., Lotfi, A., 2012. Effect of sunflower oil supplementation on in vitro fermentation patterns of forage based diets for ruminant. *Bull. Env. Pharmacol. Life Scien.* 1, 73- 77
- Newbold, C.J., Chamberlain, D.G., 1988. Lipids as rumen defaunating agents. *Proc. Nutr. Soc.* 47, 154A.

- Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84, 145-153.
- SAS, 2002. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Scholz, B., Liebezeit, G., 2012. Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. *Harmful Algae* 20, 58-70.
- Sucu, E., Udum, D., Güneş, N., Canbolat, Ö., Filya, İ., 2017. Influence of supplementing diet with microalgae (*Schizochytrium limacinum*) on growth and metabolism of lambs during the summer. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* DOI: 10.3906/vet-1606-65
- Ueda, K., A. Ferlay, J. Chabrot, J. J. Loor, Y. Chilliard, M. Doreau. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86, 3999-4007.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 2012. The rumen protozoa. Springer Science & Business Media.

Williams, A.G., 1989. Metabolic activities of rumen protozoa. In: Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. (Ed.), The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, Australia. pp. 97–126.