



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**RESPUESTA SOBRE LOS ÍNDICES GLICÉMICOS AL USO
DE SÚPER FIBRAS Y ACEITES VEGETALES CON LA
ADICIÓN DE *Saccharomyces Cerevisiae* EN LA
ALIMENTACIÓN DE CABALLOS COMO INSUMOS
ENERGÉTICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

P R E S E N T A

ALEJANDRO ESQUIVEL VELÁZQUEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México; octubre de 2021.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**RESPUESTA SOBRE LOS ÍNDICES GLICÉMICOS AL USO
DE SÚPER FIBRAS Y ACEITES VEGETALES CON LA
ADICIÓN DE *Saccharomyces Cerevisiae* EN LA
ALIMENTACIÓN DE CABALLOS COMO INSUMOS
ENERGÉTICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

P R E S E N T A

ALEJANDRO ESQUIVEL VELÁZQUEZ

COMITÉ TUTORIAL

DR. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

Director de Tesis

**DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN
ELGHANDOUR**

Codirectora de Tesis

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

Asesor de Tesis

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México; 2021.

RESUMEN

El trabajo de investigación de la presente tesis doctoral fue desarrollado en dos experimentos. En el **primer experimento**, la mitigación de los gases de efecto invernadero en el ganado equino es un área de interés en desarrollo. La emisión de metano está asociada a sus impactos negativos sobre el medio ambiente y a sus procesos de pérdida de energía durante la fermentación del intestino anterior y posterior en donde se produce. Por ello, este estudio se diseñó para examinar la influencia del aceite vegetal sobre el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el hidrógeno (H₂) *in vitro*. Se formularon tres raciones mixtas totales (RMT) y se utilizaron como sustratos de incubación. Se sustituyó el maíz rolado al vapor por aceite de maíz o aceite de soya en 0 (control), 2.4 (nivel bajo) y 4.8 (nivel alto) % de RMT con 0 y 4 mg de cultivo de levadura por g de materia seca de RMT. El uso de levadura y aceite de soya dio lugar a un aumento (P<0,05) del pH durante la fermentación. La inclusión de aceite de maíz sin levadura dio como resultado la mayor (P<0,05) digestibilidad de la materia seca, un nivel de aceite de maíz tuvo el mayor (P<0,05) tiempo de retraso requerido para la producción de CO₂ que es uno de los gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global. Sin embargo, el aceite de soya en el nivel alto produjo la menor cantidad de CO₂ a pesar de su bajo tiempo de retardo. Del mismo modo, la inclusión de un nivel alto de aceite de soya dio lugar a la mayor producción de gas (P<0,05), mientras que el nivel alto de aceite de maíz tuvo la menor producción de gas/materia seca degradada. El nivel alto de aceite de maíz en la dieta de los equinos puede servir para reducir la emisión de gases de efecto invernadero (44,5, 36,0 y 54,6% para CH₄, CO₂ y H₂ respectivamente). El nivel bajo de aceite de maíz y el nivel alto de aceite de soya pueden utilizarse cuando la digestibilidad es la principal preocupación, lo que dio lugar a un aumento del 54,9 y el 31,1% de la digestibilidad de la materia seca, respectivamente. En general, el nivel bajo de aceite de maíz parece tener una eficacia general en la fermentación.

El segundo experimento, fue llevado a cabo para determinar el efecto sinérgico de los aceites dietéticos (aceites de cártamo y de pescado) y la levadura en la emisión de biogases *in vitro* de caballos alimentados con forraje y concentrado. En este estudio se utilizaron como fuente de inóculos las heces de caballos adultos de raza pura sangre inglesa. Los aceites de cártamo y de pescado se suplementaron en dos concentraciones diferentes (2,4 y 4,8% v/p), mientras que *Saccharomyces cerevisiae* se suplementó en 4 mg/g de materia seca (MS) en la dieta de alimentación. La producción asintótica de gas (PG), la tasa de PG y el período de retardo no se vieron afectados por la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae*. La interacción nivel de aceite × *S. cerevisiae* mostró una mitigación significativa ($P=0,047$) de la emisión asintótica de metano (CH_4). De forma contradictoria, los aditivos no revelaron ninguna influencia sobre la producción asintótica, la tasa y el tiempo de retardo del dióxido de carbono (CO_2) y del hidrógeno (H_2). El pH de la fermentación no se vio afectado, mientras que la degradabilidad de la materia seca (DMS) disminuyó ($P<0,05$) debido a la suplementación de aditivos. Además, los aditivos aumentaron ($P<0,05$) la PG *in vitro* hasta las 48 h. El aceite de cártamo, el aceite de pescado y *S. cerevisiae* revelaron un impacto significativo ($P<0,05$) en la mitigación de la emisión de CH_4 . Tanto los aceites como *S. cerevisiae* mostraron una influencia no significativa en la emisión de CO_2 (mL/0,5g de MS incubada), mientras que la emisión de CO_2 (mL/0,5g de MS degradada) se redujo ($P\leq 0,05$) debido a las interacciones tipo de aceite × *S. cerevisiae* y nivel de aceite × *S. cerevisiae*. Así mismo, la interacción tipo de aceite × *S. cerevisiae* reveló una mitigación significativa ($P<0,05$) en la producción de H_2 (mL/0,5g de MS degradada) hasta las 12 h de incubación. En resumen, los aceites dietéticos y la levadura pueden ser utilizados como una estrategia de manipulación dietética para mitigar la emisión *in vitro* de CH_4 , CO_2 y H_2 de los caballos. La combinación de aceite de cártamo, aceite de pescado y levadura podría ser, sin lugar a duda, una estrategia de alimentación destacada para el ganado con el fin de mantener un ecosistema más limpio.

ÍNDICE

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
VII. RESULTADOS.....	26
VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	75
IX. CONCLUSIONES.....	83
X. LITERATURA CITADA.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingredientes de las dietas y composición química (experimento 1)42

Tabla 2. Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4 mg) o sin (-, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la cinética *in vitro* de los gases fecales totales, CH₄, CO₂ y H₂ de una ración mixta total suministrada a caballos44

Tabla 3. Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4 mg) o sin (-, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre los parámetros de fermentación fecal *in vitro*, así como sobre la producción total de gases a diferentes horas de incubación de una ración mixta total suministrada a caballos.45

Tabla 4. Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4 mg) o sin (-, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la producción *in vitro* de metano fecal (CH₄) a diferentes horas de incubación¹ de una ración mixta total alimentada a caballos.....46

Tabla 5. Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4 mg) o sin (-, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la producción *in vitro* de dióxido de carbono (CO₂) fecal a diferentes horas de incubación de una ración mixta total suministrada a caballos.....47

Tabla 6. Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4 mg) o sin (-, 0 mg) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la producción <i>in vitro</i> de hidrógeno fecal (H ₂) a diferentes horas de incubación de una ración mixta total suministrada a caballos.....	48
Tabla 7. Ingredientes de las dietas y composición de los aceites (Experimento 2)	68
Tabla 8. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para piensos sobre la cinética de los gases totales, CH ₄ , CO ₂ y H ₂ <i>in vitro</i> fecal.....	70
Tabla 9. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para piensos en los parámetros de fermentación fecal <i>in vitro</i> , así como en la PG total en diferentes períodos de incubación.....	71
Tabla 10. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos alimentarios sobre la producción de CH ₄ fecal <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación.....	72
Tabla 11. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos alimentarios sobre la producción de CO ₂ fecal <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación.....	73
Tabla 12. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para piensos sobre la producción <i>in vitro</i> de H ₂ fecal en diferentes periodos de incubación.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción total de gas en las heces de los caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soya (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0 mg) o con (+SC, 4 mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta). 38

Figura 2. Producción de metano fecal (CH₄) de los caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soya (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0 mg) o con (+SC, 4 mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta). 39

Figura 3. Producción de dióxido de carbono (CO₂) fecal de los caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soya (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0 mg) o con (+SC, 4 mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta)40

Figura 4. Producción de hidrógeno fecal (H₂) en caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soya (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0 mg) o con (+SC, 4 mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta)41

Figura 5. GP total en heces de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC. Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta=4,8% v/p, -SC = 0 mg/g MS, y +SC = 4 mg/g MS.....64

Figura 6. Producción de CH₄ fecal de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC. Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0 mg/g MS, y +SC = 4 mg/g MS.....65

Figura 7. Producción de CO₂ fecal de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC. Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0 mg/g MS, y +SC = 4 mg/g MS.....66

Figura 8. Producción de H₂ en heces de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC. Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0 mg/g MS, y +SC = 4 mg/g MS.....67

I. INTRODUCCIÓN

Las emisiones de gases de efecto invernadero procedentes del ganado son perjudiciales para el medio ambiente y para la eficiencia de la alimentación, así como un desperdicio de recursos metabólicos. Las emisiones de metano (CH_4) se asocian como desventaja sobre el medio ambiente (efecto de calentamiento global) y a su negatividad como procesos de pérdida de energía por el proceso de fermentación en intestino anterior y posterior donde se producen otros gases (Elghandour, 2019), tales como H_2 , CO_2 , N_2 y P, que a su vez se consideran gases de efecto invernadero en la industria ganadera capaces de provocar el calentamiento global y contaminar las aguas subterráneas. Aunque la acetogénesis es la principal causante de hidrógeno en el proceso de fermentación del intestino posterior, el ganado como los cerdos, las mulas y los equinos, producen metano. Johnson y Ward (Moeletsi, 2014) estimaron que el CH_4 producido en los caballos es de aproximadamente 1,2 a 1,7 Tg. Además, los equinos contribuyen en un 0,40% (kg CH_4 animal/año) (Johnson et al., 1996). Es probable que esta cantidad aumente a medida que se incremente la población equina mundial. Debido a las diferentes consecuencias del cambio climático en el medio ambiente, podría haber un efecto negativo añadido en los pastos, especialmente en las regiones donde tienen una mala distribución de pastos y calidad de forraje.

En la actualidad, se estima que la población mundial de equinos es de unos 58,8 millones (Gerber et al, 2012), y 1,33 millones de caballos se encuentran en México en el año de 2009 (INEGI, 2009), siendo de gran importancia para las actividades agrícolas (Domínguez-Vara et al., 2017). Esto implica que los caballos de México representan al menos el 2,26% de los caballos mundiales. Con el aumento global proyectado de la población ganadera, el impacto continuo del cambio climático global y el aumento esperado de la población equina en México, se deben hacer esfuerzos para combatir la emisión de gases de efecto invernadero de los equinos, siendo el metano de particular interés. Una de las estrategias más importantes para mitigar los gases de efecto invernadero en el ganado, es la manipulación de la dieta. Los nutricionistas de animales se esfuerzan por mejorar la productividad al mismo tiempo que reducen la huella de

gases de efecto invernadero mediante la suplementación dietética o la digestión anaeróbica. Este debería ser también el objetivo de los nutricionistas de equinos, que se esfuerzan por reducir su huella medioambiental.

Los extractos de plantas, las levaduras, los aceites dietéticos, aceites esenciales, las semillas de plantas y la suplementación de lípidos son opciones disponibles para reducir la producción de metano. La eficiencia de *Saccharomyces cerevisiae* para reducir la producción de CH₄ se debe a la capacidad de inducir el crecimiento de acetógenos (Hristov et al., 2013), que tendrían como objetivo competir con los metanógenos por el H₂. El aceite influye en la producción de gases de tipo invernadero a través de la reducción de protozoos, sirviendo como alternativa para el suministro de hidrógeno (en forma de biohidrogenación), la inhibición del crecimiento o las actividades de los metanógenos y quizás la reducción de la digestibilidad de la fibra (Abubakr et al., 2012). Aunque el impacto del extracto de plantas en los parámetros de fermentación del intestino anterior y posterior durante la fermentación microbiana se atribuye al compuesto bioactivo, el estudio (Abubakr et al., 2012) ha demostrado que los ácidos grasos de cadena media son una herramienta eficaz en la fermentación microbiana. De hecho, existen informes sobre la adaptación microbiana a los extractos de plantas, aceites esenciales, etc. Sin embargo, la adaptación microbiana a los ácidos grasos de cadena media, especialmente a los C-12:0 y C-14:0, es escasa o nula. Por otra parte, los ácidos grasos insaturados del aceite también podrían servir como suministros de hidrógeno alternativos, reduciendo así el hidrógeno disponible para los metanógenos. Estos ácidos grasos tienen un efecto tóxico sobre los protozoos y los metanógenos (McAllister et al., 1996). La suplementación de lípidos influye en la reducción de metano en función de su perfil de ácidos grasos (O'Connor et al., 2004), especialmente el ácido graso de cadena media (Martin et al., 2010). El aceite de soya y el aceite de maíz son ejemplos de aceites dietéticos que pueden utilizarse y ambos han demostrado su capacidad para reducir el metano en los rumiantes (Wang et al., 2016) (Winders et al., 2018), lo que puede atribuirse a los ácidos grasos insaturados y a la reducción de los protozoos (que reducen el intercambio de hidrógeno con los metanógenos). Los ácidos grasos poliinsaturados alteran la composición grasa de los fosfolípidos de las membranas celulares de los microbios (Keweloh y Heipieper, 1996) y la alteración de la estructura de la bicapa a

través de la forma de doble enlace de las moléculas (Calder. 1996). Otros medios incluyen la alteración de la relación entre acetato y propionato, la saturación del ácido graso insaturado en ácido graso saturado (Elghandour et al, 2019) (Martin et al, 2010) (Nevel y Demeyer, 1996) también conocida como biohidrogenación que ayuda a reducir el hidrógeno disponible para la metanogénesis, y la toxicidad en los microbios del intestino, como las bacterias, los metanógenos y los protozoos (Elghandour et al, 2019), y reduce la digestibilidad de la pared celular, especialmente de la descomposición de la fibra, a través de la toxicidad para las bacterias celulolíticas en la dieta basada en forraje (Nagaraja et al, 1997).

Sin embargo, el cambio climático es una preocupación ecológica colosal para la humanidad, en la que influye directa o indirectamente la ganadería a través de la emisión de distintos gases de efecto invernadero (GEI) perjudiciales, especialmente metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2) en el medio ambiente. De hecho, las industrias ganaderas representan entre el 18 y el 20% de las emisiones mundiales de GEI, lo que eleva la temperatura ecológica a un ritmo alarmante. Sorprendentemente, se supone que la demanda mundial de productos derivados de los animales aumentará en el futuro debido al crecimiento exponencial de la población humana (Bodirsky et al., 2015). Los no rumiantes producen alimentos de alta calidad y renuevan su metabolismo utilizando recursos alimenticios comestibles discretos mediante un mecanismo digestivo anaeróbico. En general, los componentes de carbohidratos del alimento incluyen fibras vegetales que han sido degradadas anaeróbicamente por la microbiota con la liberación de CO_2 y H_2 . Teniendo en cuenta la vía predominante de emisión de CH_4 , los metanógenos utilizan el CO_2 y el H_2 como componente fundamental (Haque, 2018). En las últimas décadas, se ha implementado una plétora de estrategias para mitigar la emisión de GEI del sistema de producción ganadera. Sobre todo, la mejora de la digestibilidad del forraje mediante la modificación de la vía de fermentación se considera una de las prácticas nutricionales más recomendables para reducir la emisión de GEI en los no rumiantes (Boadi y Wittenberg, 2002). En este sentido, la manipulación de la dieta o la suplementación de los aditivos de los piensos se asegura como un enfoque idealista y pragmático con el fin de aumentar la productividad de los animales, así como la reducción de la producción de gases perjudiciales. De hecho, la suplementación de

aditivos propicios en la alimentación de los animales conduce a la posterior reducción de la disponibilidad de sustrato para la metanogénesis mediante la alteración de las vías metabólicas (Haque, 2018).

En los últimos años, los aceites dietéticos se están utilizando no solo para mejorar el nivel de energía, sino también para manipular el proceso de fermentación del alimento de los animales. Curiosamente, los aceites se consideran aditivos nutricionales persuasivos para deprimir la metanogénesis sin influir en otros factores adecuados (Wanapat et al., 2013). De hecho, el uso de aceites como alternativa rotunda a los carbohidratos provoca una menor fermentación, con lo que se adquiere una menor emisión de GEI. El proceso de mitigación de GEI se consigue por la disminución del nivel de fermentación de las materias orgánicas y la digestibilidad de las fibras, la reducción de la vía metanogénica y la inhibición directa de los metanógenos a través de la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados (Johnson y Johnson, 1995). Por otra parte, también se sabe que las levaduras afectan a las actividades metabólicas de la microbiota, lo que repercute en el rendimiento de los animales. Además, las levaduras reducen la producción de gases de efecto invernadero nocivos del ganado al disminuir los recuentos de protozoos, mejorar el rendimiento de butirato o propionato, y promover la acetogénesis para co-metabolizar el H₂ con los metanógenos (Ingale et al., 2013). Las levaduras tienen la potencialidad única de inducir la fermentación de importantes componentes nutricionales indispensables para el crecimiento microbiano y la bioactividad (Polyorach et al., 2014; Patra, 2012).

A pesar de la utilización de distintos aceites y algunas levaduras como aditivos destacados año tras año, la suplementación de aceite de cártamo (fuente vegetal), aceite de pescado (fuente animal) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la alimentación animal para reducir la emisión de biogases perjudiciales es escasa, probablemente indeterminada en los no rumiantes.

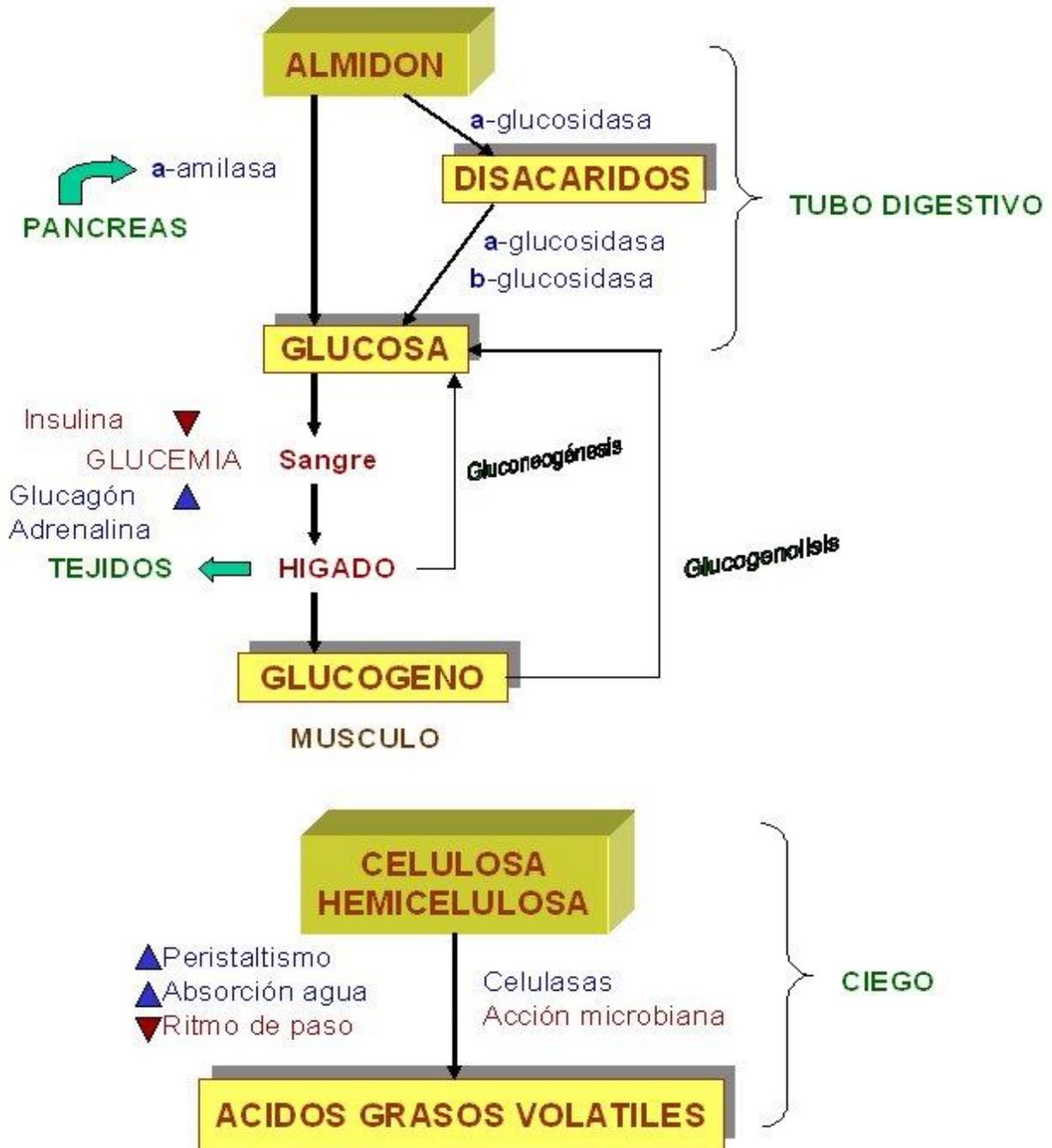
II. REVISIÓN DE LITERATURA

El caballo es un animal monogástrico, en donde la mayor parte de la comida es degradada en el ciego y el colon. Una gran cantidad de saliva es producida a lo largo del esófago permitiendo, pero sobre todo facilitando el paso de la comida, además de actuar como bufferizante en el proceso de digestión (Cunha, 1991). Una vez recorrido el esófago, el alimento llega al estómago en donde el paso por el mismo es relativamente rápido, sin embargo, una buena porción del alimento permanece de 2 a 6 horas en la parte inferior del estómago (Pilliner, 1991).

Como producto del proceso de fermentación de carbohidratos se obtiene ácido láctico y el nivel del pH disminuye a 2.6 en el estómago (Frape, 2010). La mayor actividad enzimática y absorción de nutrientes tiene parte en el intestino delgado. Llegando al duodeno el alimento proveniente del estómago es muy ácido y es neutralizado por la bilis producida en el hígado (Colville y Bassert, 2008). Las proteínas son digeridas para producir aminoácidos y las grasas son transformadas en ácidos grasos volátiles y glicerol (Pagan, 1998).

El alimento llega al ciego y al colon aproximadamente 3 horas después de que el caballo lo consumió (Frape, 2010). El pH del ciego y del colon tiene las condiciones ideales para el correcto funcionamiento de las bacterias anaeróbicas. En esta parte del tracto digestivo se presenta la fermentación de carbohidratos complejos, así como la síntesis de aminoácidos esenciales y de algunas vitaminas (Pagan, 1998).

DIGESTION Y ABSORCION DE CARBOHIDRATOS (monogástricos)



Cuando tenemos un alimento alto en almidones, los residuos son fermentados en el ciego y el colon y el proceso tiende a volverse más lento, lo cual puede favorecer el crecimiento de bacterias amilolíticas y ocasionar un incremento de ácidos grasos volátiles (AGVs) y la producción de ácido láctico, lo que genera una baja considerable del pH (Biddle et al., 2013). La disminución del pH puede llevar al caballo a una acidosis o a generarle un cólico.

El ácido láctico obtenido del proceso de fermentación del almidón en el estómago (Varloud et al., 2007) y posteriormente degradado en glucosa por un proceso enzimático en el intestino delgado, es transportado a través de la pared gastrointestinal (Cunha, 1991; Pilliner, 1993).

La ingesta de almidones debe de ser cuidadosamente controlada, cantidades excesivas pueden incrementar los niveles de glucosa en sangre por arriba de lo normal 4.4 – 4.7 mmol/L a más de 6.5 mmol/L después de 2 horas de haber alimentado al caballo (Frape, 2010). Geor (2010) sugiere que la ingesta de almidón debe de ser limitada de 1 – 1.5 gr/kg P.C./día. Reemplazar granos de cereales ricos en almidón con alimentos a base de carbohidratos sin contenido de almidón como la cascara de soya (Lindberg, 2005) o grasa, o aceites (Potter et al., 1992b) pueden ser una alternativa para prevenir los problemas relacionados al alto consumo de almidón.

Una dieta para caballos bien balanceada debe de contener solo el 4% de grasa (Pilliner, 1993). La grasa es degradada mediante un proceso enzimático en AGVs y glicerol en el intestino delgado y posteriormente son absorbidos (Cunha, 1991). Niveles excesivos de grasas pueden reducir la fermentación y la digestibilidad de la fibra. (Rossister, 2008). El cuidado de la dieta y el aporte de los suplementos al caballo son una de las partes más importantes de su manejo diario. Cada caballo debe tomar alimentos y suplementos nutricionales acordes a la disciplina que vaya a realizar y a su estado de salud. Normalmente, al planear la alimentación del caballo la mayoría de la gente tiene en cuenta los hidratos de carbono en forma de cereales, la proteína y la fibra. Existe sin embargo una parte muy importante de la dieta que a veces pasa desapercibida, y esos son los aceites.

2.PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LOS FORRAJES Y CONCENTRADOS.

2.1FORRAJES. -

Los forrajes están compuestos de contenido celular (proteína, grasa y carbohidratos solubles) y también de paredes celulares (celulosa, hemicelulosa y lignina); existe una variación entre la proporción de los contenidos o tipos de paredes celulares, y es debido a la fuente de forraje y la madurez de este al tiempo que fue realizada la cosecha. El contenido celular es altamente digestible (~80 – 100%; Fannesbeck 1968, 1969), mientras que la verdadera digestibilidad de las paredes celulares es menor (~40 – 50%; Fannesbeck 1968, 1969). Por lo que la energía y el valor nutricional de los forrajes puede variar considerablemente (Ragnarsson y Lindberg 2008, 2010). Esto implica que el uso de forraje en la dieta de un caballo debe de ser cuidadosamente seleccionado para poder brindarle los niveles apropiados de energía y de nutrientes y no solo cubrir las necesidades de fibra para el correcto funcionamiento del tracto digestivo.

2.2 INGREDIENTES EN LOS CONCENTRADOS:

2.2.1-CEREALES. -

El contenido de proteína, grasa y carbohidratos puede variar considerablemente según sean las fuentes de cereales. Por otro lado, algunas diferencias en las propiedades nutricionales pueden ser relacionadas a la variación de la composición química debida a alteraciones climáticas, factores agronómicos y la variedad del cereal (Åman et al., 1985, Pettersson y Åman, 1987).

El contenido proteico es mayor en el trigo, seguido en orden descendiente por el grano de avena, cebada y con menor contenido el arroz y el grano de maíz. Sin embargo, la calidad de la proteína es mayor para el grano de avena, cebada y el arroz, que para el trigo y el maíz (Degussa, 1996).

El contenido de grasa es 2 veces más alto en la avena y el maíz, en comparación al del trigo y el arroz. Esto se ve reflejado también en el contenido individual de ácidos grasos

esenciales (linoleico y linolénico). Basado en datos existentes, se puede estimar que la grasa que aporta la avena puede proveer aproximadamente el 14% de la energía digestible (Lindberg et al., 2006). En contraste con otros cereales comúnmente utilizados en dietas de monogástricos, en donde la grasa solo provee del 3-5% del contenido de la energía digestible.

En cuanto al contenido de almidón, el arroz es el que tiene mayor contenido, seguido del maíz, trigo, cebada y por último el grano de avena. El almidón está compuesto de polímeros de glucosa y se presenta en 2 formas: amilasa y amilopectina. El almidón contiene distintas proporciones de amilasa y amilopectina y el rango entre uno y otro depende del origen botánico del almidón. Por ejemplo, el trigo contiene un 30% de amilasa del total de almidón, mientras que el maíz contiene el 70%. Por lo que el peso molecular del almidón puede variar significativamente, influyendo en la digestibilidad del alimento. La disponibilidad de glucosa es mayor cuando el tipo de almidón es amilopectina (Lindberg, 2006). Una ingesta alta de almidón puede derivar en varias enfermedades para el caballo, tales como el cólico, úlceras gástricas y laminítis (Beyer, 1998).

Para la porción de fibra el grano de avena es el de mayor contenido, seguido de la cebada, trigo, maíz y arroz (Lindberg, 2006). Por lo general se dice que algunas causas de cólicos y laminítis son el resultado de cambios en la población microbiana y la fermentación en el ciego y el intestino grueso del caballo que puede ser causado por la cantidad de almidón en la dieta (Bailey et al., 2004, Julliand et al., 2006).

2.2.2 INSUMOS PROTEICOS. -

Además de ser altos en proteína, los contenidos de fibra, grasa y almidón varían considerablemente entre cada insumo. La calidad de la proteína (Lisina como % de proteína cruda) es más alta en alimentos como en la colza, soya, chícharo, haba y papa, mientras que para otros insumos la calidad de la proteína es mínimamente mejor que la de los cereales (Lindberg, 2006).

La necesidad de suplementar la dieta con un insumo rico en proteína depende de los requerimientos del caballo, la calidad de la fuente de forraje, así como la cantidad de forraje en la dieta.

2.2.3 INSUMOS DE CARBOHIDRATOS SIN ALMIDÓN. -

En contraste con los cereales los carbohidratos sin almidón son caracterizados por tener una fracción del carbohidrato compuesta de azúcares hidrosolubles y/o fibra dietética.

Son bajos en su contenido de grasa cruda y algunos en su contenido de proteína cruda. Los insumos clasificados en esta categoría son básicamente subproductos y en general el contenido energético es alto. (Lindberg, 2006). Dentro de este grupo existen 3 subgrupos, los que son ricos en azúcares, ricos en pectina y ricos en celulosa.

-Ricos en azúcares. - En general la energía que contienen los insumos de este sub-grupo es alta. Las melazas y los jarabes se encuentran dentro de los ricos en azúcares. Los azúcares simples tales como la glucosa y la fructosa son bien utilizados por el caballo y son absorbidos en el intestino delgado. Esto se ve reflejado en un incremento en los valores de la glucosa plasmática (Bullimore et al., 2000).

-Ricos en pectinas. - Para este estudio es el subgrupo de mayor importancia, en el encontramos insumos como la pulpa de remolacha, pulpa de cítricos, cascara de soya de los cuales una fracción de la fibra de la dieta está compuesta de pectina. La energía que contiene este grupo también es alta. Los valores de la energía metabolizable y digestible de estos insumos son comparables a los que aporta la avena regular.

La cascara de soya es potencialmente recomendada para el uso en la alimentación de caballos, de igual forma ha sido satisfactoriamente utilizada en la alimentación de rumiantes por mucho tiempo. El componente de carbohidrato en la cascara de soya es caracterizado por tener un alto contenido de fibra en la dieta (~80 % de MS) y un alto contenido de pectina (~30% de MS) (Karr-Lilienthal et al., 2005). En contraste el contenido de carbohidratos hidrosolubles y almidón es bajo.

Estudios han demostrado que caballos alimentados con cascara de soya tienen un índice glicémico menor en comparación con los que fueron alimentados con cereales y concentrados. La cascara de soya es mayor y rápidamente fermentada por la microflora del ciego en comparación de la paja (Karr-Lilienthal et al., 2005).

-Ricos en celulosa. - En este subgrupo entran los insumos tales como el salvado de arroz, cascarilla de avena y cascarilla de cebada. Son caracterizados por tener un alto contenido de fibra dietética y celulosa (Karr-Lilienthal et al., 2005). Por lo general el contenido de energía en este subgrupo es bajo.

2.3 METABOLISMO DEL CABALLO CON DIETAS ALTAS EN GRASA

La adaptación metabólica a las dietas altas en grasa implica el aumento de la producción de bilis y lipasa pancreática que estimula la absorción intestinal de grasa (Hyypa 1999), aumenta el flujo sanguíneo de ácidos grasos (Geelen et al., 1999) sin alterar la concentración de los mismos por lo que la movilización de ácidos grasos corporales debe estar también incrementada. La adaptación a dietas altas en grasa también aumenta la capacidad oxidativa del músculo (Dunnett et al., 2002) ya que aumenta la actividad de algunos enzimas (carnitina palmitil-transferasa, citrato sintetasa) que son altamente oxidativos (Geelen et al., 2001).

2.4 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACION DE LEVADURAS EN CABALLOS.

En las últimas 2 décadas han sido reportados los efectos a la suplementación de levaduras en el proceso de digestión y la población microbiana del caballo. Regularmente se observan efectos positivos como el incremento en la disponibilidad de los nutrientes de la dieta, por otro lado, la población microbiana puede o no ser incrementada (Lattimer et al., 2007; Morgan, et al., 2007).

Sin embargo, la suplementación de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas para caballos ha demostrado una disminución en la acumulación de lactato, así como una disminución del pH, generando un ambiente idóneo para la actividad microbiana (Jouany et al., 2008).

2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DESCRIPCIÓN DE UNA CÉLULA DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*. -

La levadura es un hongo microscópico (organismo unicelular del reino vegetal) que suelen medir de 5 a 10 micras, se consideran como un organismo facultativo anaeróbico, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (García, 2001). La propagación de las levaduras es un proceso mediante el cual la levadura convierte al oxígeno y al azúcar por medio del metabolismo oxidativo.

La levadura en sí proporciona vitaminas del complejo B, minerales, es buena fuente de proteína y aminoácidos. Aproximadamente el 40% del peso de la levadura seca consiste en proteína. Aun cuando la levadura no es un ingrediente proteico como tal, la proteína de la célula de la levadura en su gran mayoría está compuesta por aminoácidos esenciales como Lisina, Metionina, Triptofano, entre otros (García, 2007 y García, 2001). Los principales productos utilizados comercialmente en la alimentación animal provienen de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Apergyllus oryzae*.

2.4.2 TIPOS DE LEVADURAS. -

Dentro de las descripciones más afines en producción animal García (2007) explica los tipos de la siguiente manera:

- Levadura inactiva o muerta: Mezcla física con granos de fermentación y levadura viva. Son considerados como nutrilitos y su principal mecanismo de acción es proporcionar nutrientes a los organismos del rumen. No presentan viabilidad.
- Levadura activa o viva. - es un producto a base de productos de fermentación y levadura viva. Tiene la factibilidad de cambiar el tipo y número de microorganismos presentes y mejorar el patrón de fermentación. Tienen alta viabilidad.

- Levadura mineralizada. - Producto derivado de la fermentación, en donde la levadura después de ser sometida a un medio alto de un mineral específico absorbe al mineral, obteniéndose un mineral ligado a la levadura.
- Levadura de cerveza. - subproducto derivado de la producción de cerveza, su principal función es el aporte de proteína y vitaminas del grupo B.

2.4.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE UNA LEVADURA ACTIVA EN CABALLOS.

La función de las levaduras vivas en caballos es maximizar la digestibilidad, mejorar el patrón de fermentación a nivel del ciego, reducir la acumulación de ácido láctico e incrementar la síntesis tanto de energía como de proteína.

Los caballos tienen una limitada capacidad para digerir grandes cantidades de almidón y comúnmente el exceso del mismo contenido en los granos llega al tracto digestivo y no es digerido en su totalidad. El efecto adverso de la baja capacidad de digestión de almidones a nivel del intestino delgado ocasiona una alta producción de ácido, el cual origina de manera proporcional una baja en el pH, baja la motilidad intestinal, altera el balance microbiano e incrementa la susceptibilidad a cólicos o laminitis (Ramírez, 2008).

El suministro de granos de cereales a caballos es una práctica común que se realiza de la cual el animal obtiene la energía complementaria para cubrir sus requerimientos cuando su alimentación es a base de forrajes. Potter et al, (1992) señalan que cierta cantidad de almidón a nivel de intestino delgado no es digestible, lo cual altera la relación forraje-grano e induce a un disturbio del balance microbiano. Lo anterior conlleva a una acumulación de ácido láctico (baja del pH) y reduce la población de bacterias celulolíticas a nivel intestinal, esto incrementa la posibilidad de incidencia de cólicos, úlceras gástricas y laminitis (Kronfeld y Harris, 1997). Una de las estrategias nutricionales con mayor eficacia para contrarrestar dichos problemas ha sido el uso de levaduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*. Medina et al. (2002) señalan que el suministro de levaduras vivas mejora el balance microbiano a nivel intestinal, estimula la actividad de bacterias celulóticas e incrementa la digestibilidad de los nutrientes. Mientras que Jouany et al.

(2008) señalan un incremento estadísticamente significativo en la digestibilidad de la fibra y mejora las condiciones a nivel intestinal con el uso de *S. cerevisiae* en caballos alimentados con dietas ricas en almidón.

2.5- INDICE GLICEMICO EN CABALLOS.

Para tener una dieta más saludable hoy en día la utilización del grano está siendo reemplazada por ingredientes llamados super-fibras (pulpa de cítricos, pulpa de remolacha, salvado de arroz y cascara de soya), ya que son una buena alternativa como ingredientes con un alto contenido energético para los caballos (Duren, 2000).

El metabolismo energético puede ser dividido en dos procesos: el metabolismo de glucosa y el metabolismo de lípidos (Mcarde, 2001). La estabilidad glicémica es mantenida principalmente por 2 vías metabólicas; el consumo de carbohidratos y la gluconeogénesis, los cuales utilizan principalmente el propionato (Frape, 2008).

Dietas con altos contenidos de alimentos procesados resultan en altos niveles de glucosa e índices glicémicos (Gobesso et al., 2009). El metabolismo energético puede ser evaluado por diferentes variables sanguíneas, tales como los triglicéridos, el colesterol y los ácidos grasos de cadena corta (Wittwer, 2000). Los microorganismos en ciego y colon degradan la fibra del alimento y la convierten en ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico, láctico y butírico los cuales son responsables de aportar del 30 al 70% del total del requerimiento energético del caballo, esto dependiendo del contenido de fibra, carbohidratos solubles o del contenido de almidón en la dieta (Lewis, 2000).

El valor glicémico para un alimento es determinado mediante la comparación del área debajo de la curva de respuesta de glucosa plasmática del alimento a probar con la de un alimento estándar. Para el caso del caballo el alimento estándar es el grano de avena. El índice glicémico de cualquier alimento es calculado y expresado como el porcentaje de la respuesta de glucosa, con el de la respuesta del alimento estándar (Wolever, 1991).

Formular dietas para caballos que produzcan respuestas glicémicas atenuadas puede brindar beneficios en la salud del caballo, como la prevención o disminución de la resistencia a la insulina y efectos relacionados a laminitis y a otros trastornos metabólicos (Kronfeld, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha encontrado que la alimentación tradicional de caballos basada en el uso de alimentos concentrados con altos contenidos de cereales que aportan cantidades elevadas de almidón se asocia a trastornos digestivos en el caballo, así mismo, que dicha alimentación genera una producción elevada de gases de tipo invernadero, por lo que el uso de las denominadas super fibras y los aceites con la adición de levaduras vivas pueden contribuir a disminuir dichos trastornos, cubriendo sus necesidades nutricionales.

IV. HIPÓTESIS

La inclusión de súper fibras y aceites en presencia del aditivo *Saccharomyces cerevisiae*, contribuyen a mejorar significativamente la microbiota de las cámaras de fermentación en caballos, generando una disminución en la producción de gases de tipo invernadero.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los distintos niveles de inclusión de aceites de origen vegetal y animal como aditivos en la alimentación de caballos, con o sin la adición de *Saccharomyces cerevisiae* sobre los parámetros de producción de gases de tipo invernadero, en comparación a una dieta convencional en caballos maduros con trabajo moderado.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la cinética de producción de gas *in vitro* con distintos niveles de inclusión entre dos aceites de origen vegetal y entre un aceite de origen animal y uno de origen vegetal en dietas para caballos con o sin la adición de levadura viva.
- Comparar los parámetros de fermentación fecal entre una dieta convencional para caballos y dietas con distintos niveles de inclusión de aceites de origen vegetal y animal.
- Determinar la producción de CO₂ e H₂ como respuesta a la adición de los aditivos con distintos niveles de inclusión en comparación con una dieta convencional.
- Comparar el efecto a la adición de los distintos aceites y diferentes niveles de inclusión como aditivos, sobre las emisiones de CH₄.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 EXPERIMENTO 1:

6.1.1 Sustratos y cultivo de levadura

En la primera prueba, se prepararon cinco dietas totalmente mezcladas (DTM) fueron formuladas, como se muestra en la (Tabla 1), y utilizadas como sustratos para la incubación. Se reemplazó grano de maíz rolado al vapor por aceite maíz o aceite de soya (Oleíco; Coral Internacional SA de CV, San Luis Potosí, México) a 0% (control), 2.4% (nivel bajo) y 4.8% (nivel alto) de la DTM. El cultivo de levadura (Procreatin 7; Safmex / Fermex SA de CV, Toluca, México) fue utilizado en forma de polvo, con un contenido de 1×10^{10} UFC/g y fue agregada a cada DTM a 0 y 4mg/g de materia seca (MS).

6.1.2 Incubación *In Vitro*

Antes del comienzo de la incubación, el contenido fecal (la fuente de inóculo) fue colectado directo del recto de 6 caballos de raza pura sangre ingles en el Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México (con un rango de edad de 9 a 11 años y un peso de 510 ± 20 kg) antes de ser alimentados por la mañana. Los caballos fueron alimentados diariamente con 1.5 kg dos veces al día con un alimento comercial (HORSE POWER Alimento Rolado para Caballo, ALPLA SPR de RL México) y heno de avena a libre acceso. El contenido fecal de cada caballo fue mezclado para obtener una muestra homogénea de heces para cada tratamiento y fue mezclada con la solución amortiguadora de Goering and Van Soest, 1970 sin tripticasa en una proporción de 1:4 peso/volumen. Después de la mezcla el medio de incubación fue filtrado a través de cuatro capas de estopilla en un matraz con un espacio libre de oxígeno y utilizado para inocular tres corridas idénticas de la incubación en botellas de suero de 120ml, que contenían 0.5g de MS del sustrato.

Un total de 90 botellas (dos dosis de levadura × tres repeticiones × tres corridas × cinco sustratos) más tres botellas sin sustrato y levadura como blancos fueron utilizadas. Después de llenar todas las botellas, fueron adicionadas con CO₂ e inmediatamente cerradas y selladas con tapones de goma, fueron agitadas y colocadas en un incubador a 39°C. Las producciones de gas y CO₂ fueron medidas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas utilizando el Pressure Transducer Technique (Extech Instruments, Waltham) de Theodorou et al., 1994. En el mismo periodo de incubación, las concentraciones de CO₂, CH₄, y H₂ fueron medidas utilizando un detector de gas por difusión (Air Quality Monitor YesAIR; Critical Environment Technologies Canada Inc, Delta, BC, Canada). Al final de la incubación a las 48 horas, las botellas fueron destapadas para medir el pH utilizando un detector digital de pH (Conductronic pH15, Puebla, México); el contenido de cada botella se filtró al vacío en crisoles de vidrio (coarse porosity no. 1 tamaño del poro 100 – 160 µm; Pyrex, Stone, UK) y los residuos de la incubación fueron secados a 105°C durante la noche para estimar la degradabilidad de la MS (DMS).

6.1.3 Análisis Químicos y cálculos

Las muestras de las DTM fueron analizadas para MS (#934.01), cenizas (#942.05), N (#954.01) y extracto etéreo (EE; #920.39) de acuerdo con la Association of Official Analytical Chemists, 1997.

La energía digestible (ED; Mcal/kg) fue calculada como $ED = (3.6 + 0.211 \text{ proteína cruda [PC]} + 0.421 \text{ EE} + 0.015 \text{ fibra cruda})/4.184$ NRC, 2007.

La proteína cruda digestible (PCD; g/kg MS) fue calculada como $PCD = 4.49 + 0.8533 \text{ PC}$ (Marounek et al., 2002).

Para estimar la cinética de los parámetros de producción de gas (PG), los resultados de la PG fueron ajustados utilizando la opción NLIN del SAS, 2002., de acuerdo con la ecuación de France et al. 2000, como:

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

En donde A es el volumen de PG al tiempo t, b es la asintótica de la PG (ml/g de MS), c es la tasa de PG (por hora) y L (hora) es el tiempo de retraso discreto antes de la PG.

6.1.4 Análisis Estadísticos

Los datos de cada una de las tres corridas dentro de la misma muestra de cada una de las cinco muestras individuales de las DTM fueron promediados antes de los análisis estadísticos. Los valores medios de cada muestra individual fueron utilizados como la unidad experimental. Los resultados de la PG *in vitro* y los parámetros de fermentación fecal fueron analizados mediante un diseño factorial utilizando la opción PROC GLM del (SAS, 2002) como:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + (R \times A)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es toda observación de la i th DTM (R_i) con la j th dosis de levadura (A_j), μ es la media general, $(R \times A)_{ij}$ es la interacción entre el tipo de dieta y la dosis de levadura y E_{ijk} es el error experimental. Contrastes polinominales lineales y cuadráticos fueron utilizados para examinar las respuestas al incremento en los niveles de adición de la prueba (reemplazo del grano de maíz rolado al vapor y las dosis de levadura). La significancia estadística se declaró cuando $P < .05$.

6.2 EXPERIMENTO 2:

6.2.1. Sustratos y cultivo de levadura

Las dietas fueron formuladas en el primer experimento y utilizadas como sustratos. La tabla 7 muestra los ingredientes en las dietas y la composición de los aceites dietéticos utilizados. El grano de maíz rolado al vapor fue sustituido por los aceites de cártamo y pescado (Oleico Coral Internacional, SA de CV, San Luis Potosí, México) en las siguientes concentraciones, 0 (control), 2.4 y 4.8% volumen/peso. Se formularon dietas

similares en la segunda prueba y fueron utilizadas como sustratos sustituyendo el grano de maíz rolado al vapor por aceite de pescado en las concentraciones de 0 (control), 2.4 y 4.8% volumen/peso. El cultivo de levadura Procreatin 7 (Safmex/Fermex SA de CV, Toluca, México) a 0 y 4mg/g de materia seca (MS) constituida por 1×10^{10} células fue suplementada en cada dieta.

6.2.2. incubaciones *in vitro* y análisis químicos

El recto de cuatro caballos pura sangre inglés (edad entre 8 a 10 años, con peso de 490 ± 21.1 kg) fueron utilizados para recolectar heces como fuente de inóculo. Las heces fueron extraídas del Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Estado de México, México. Los caballos fueron alimentados con 4kg de concentrado cada día (HORSE POWER Alimento Rolado para Caballo, ALPLA SPR de RL México) y se ofreció heno de avena a libre acceso. Las muestras de las heces fueron recolectadas directo del recto. Posteriormente, las heces fueron homogenizadas revolviendo con la solución amortiguadora de (Goering y Van Soest, 1970). Se utilizó estopilla para colar la mezcla en un espacio libre de oxígeno. La mezcla fue almacenada en botellas de suero las cuales contenían 1 g de sustrato de MS. En este experimento se utilizaron 93 botellas, mismas que fueron llenadas y adicionadas con CO₂. Las botellas fueron cerradas apropiadamente, agitadas y llevadas a la incubadora con una temperatura de 39°C. La producción de gas y la emisión de CO₂ fueron estimadas hasta las 48 horas utilizando un transductor de presión (Extech instruments, Waltham) siguiendo el método de (Theodorou et al., 1994). Mas adelante se estimaron las emisiones de CH₄, CO₂, y H₂ con un detector de gases (AIR QUALITY

MONITOR YesAIR, Critical Environment Technologies Canada Inc., Delta, BC, V4G 1 M3, Canada).

Las botellas fueron destapadas después de completar el tiempo de incubación y se llevó a cabo la medición del pH utilizando el medidor de pH (Conductronic pH15, Puebla, México). El contenido de las botellas fue vaciado en crisoles. La degradabilidad aparente de la materia seca (DMS) fue calculada después de secar los residuos durante la noche a 105°C.

6.2.3. Cálculos

Para calcular los parámetros en cinética de la PG, los resultados de la PG (ml/g MS);

C = tasa de la PG (h) y L (h) = el tiempo de retardo de la PG.

El rendimiento del gas por 0.5 g de MS degradada fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

[Volumen de gas (ml de gas por 0.5 g de MS incubada × el peso de la muestra de MS degradada)]/ el peso de la muestra de MS incubada.

6.2.4 Análisis estadísticos

Los estudios fueron realizados por triplicado y fueron calculados sus valores medios. Los datos de la producción de gas *in vitro*, así como, los resultados de la fermentación de las heces fueron estimados utilizando la opción PROC GLM del programa (SAS, 2002) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + (R \times A)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es toda observación de la i th DTM (R_i) con la j th dosis de levadura (A_j), μ es la media general, $(R \times A)_{ij}$ es la interacción entre el tipo de dieta y la dosis de levadura y E_{ijk} es el error experimental. La significancia estadística se declaró cuando $P \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Experimento 1:

Influencia de la inclusión en la dieta de aceites de maíz y soja, en combinación con el cultivo de levadura viva, en la producción de metano, dióxido de carbono e hidrógeno en heces de caballos

ARTICULO PUBLICADO EN LA REVISTA:

JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, (2019): 74, 42-50.

Factor de impacto: **1.583**

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.12.016>



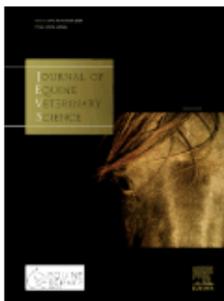
ELSEVIER

[About Elsevier](#)

[Products & Solutions](#)

[Services](#)

[Home](#) > [Journals](#) > [Journal of Equine Veterinary Science](#)



ISSN: 0737-0806

Journal of Equine Veterinary Science

An Official Publication of the [Equine Science Society](#) and the Official Journal of the [International Symposium on Equine Reproduction](#)

Publishing options: OA Open Access ↗ S Subscription ↗

[↗ Guide for authors](#) [Track your paper](#) ∨ [Order journal](#) ∨



Original Research

Influence of Dietary Inclusion With Corn and Soybean Oils, in Combination With Live Yeast Culture, on Horse Fecal Methane, Carbon Dioxide and Hydrogen Production



Alejandro E. Velázquez^a, Mona M.M.Y. Elghandour^a, Moyosore J. Adegbeye^b, Alberto B. Pilego^a, Laura H. Vallejo^a, Abdelfattah Z.M. Salem^{a,*}, Moisés C. Salazar^{c,**}

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, Mexico

^b Department of Animal Science, College of Agriculture, Joseph Ayo Babalola University, Ikeji-arakeji, Ilesha, Nigeria

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2018
Received in revised form
20 December 2018
Accepted 21 December 2018
Available online 25 December 2018

Keywords:

Greenhouse gases
Yeast
Horses
Corn oil
Soybean oil

ABSTRACT

Greenhouse gases mitigation in equine is a new developing area of interest. Methane (CH₄) emission is associated with its negative impacts on the environment and its energy loss processes in foregut and hindgut fermenter where it is produced. Hence, this study was designed to examine the influence of two vegetable oils on carbon dioxide (CO₂), CH₄, and hydrogen (H₂) *in vitro*. Five total mixed rations (TMR) were formulated and used as incubation substrates. Steam rolled corn was replaced by corn oil or soybean oil at 0% (control), 2.4% (low level), and 4.8% (high level) of TMR with 0 and 4 mg of yeast culture per gram dry matter of TMR. The use of yeast and soybean oil resulted in the increased ($P < .05$) pH during fermentation. Inclusion of corn oil without yeast resulted in the highest ($P < .05$) dry matter digestibility, and a high level of corn oil had the highest ($P < .05$) lag time required for CO₂ production, which is one of the contributor greenhouse gases for global warming. However, high soybean oil produced the least fecal CO₂ despite its low lag time. Similarly, inclusion of high soybean oil resulted in the highest ($P < .05$) fecal gas production, whereas high corn oil had the lowest gas production/dry matter degraded. High level of corn oil in equine diet may be used to reduce fecal greenhouse gas emission (44.5, 36.0, and 54.6% for CH₄, CO₂, and H₂, respectively). Low level of corn oil and high level of soybean oil may be used when digestibility is the primary concern, which resulted in 54.9% and 31.1% increase in fecal dry matter digestibility, respectively. Overall, low level of corn oil seems to be having general effectiveness on fermentation in horses.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Greenhouse gases emissions from livestock are both deleterious and waste of metabolic resources to our environment and feed efficiency, respectively. Methane (CH₄) emissions are associated

with its disadvantage on the environment (global warming effect) and its negativity as energy loss processes in foregut and hindgut fermenter where it is produced [1] as well as other H₂, CO₂, N₂, and P, which are greenhouse gases of livestock industry capable of causing global warming and polluting groundwater. Although acetogenesis is the main hydrogen sink in hindgut fermenters, livestock such as pigs, mules, and equine produce CH₄. Johnson and Ward [2] estimated the CH₄ produced in horses to be about 1.2–1.7 Tg. Furthermore, equine contribute about 0.40% (kg CH₄ animal/year) [3]. This quantity is likely to increase as global equine population increases. Because of the varying consequence of climate change on the environment, there could be added negative effect on pasture especially in regions where they have poor distribution of pasture and forage quality.

Presently, global equine population is estimated to be about 58.8 million [4], and 1.33 million horses were in Mexico around 2009 [5] where they are important for agricultural activities [6]. This implies

Animal welfare/ethical statement: The research was performed in accordance with the ethical standard laid down in the 1996 declaration of Helsinki and its later amendments.

Conflict of interest statement: There was no conflict of interest.

* Corresponding author at: Abdelfattah Z.M. Salem, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000 Toluca, Estado de México, Mexico.

** Corresponding author at: Moisés C. Salazar, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Km. 3.5 Carretera Cd. Altamirano-Iguala, CP 40660, Cd. Altamirano, Guerrero, México.

E-mail addresses: asalem70@yahoo.com, salem@uaemex.mx (A.Z.M. Salem), mcipriaano@hotmail.com (M.C. Salazar).

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.12.016>

0737-0806/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

that Mexico horse accounts for at least 2.26% of global equine horse. With the projected global increase in livestock population, continuous impact of global climate change, and expected increase in equine population in México, efforts should be made to combat equine greenhouse gases emission with CH₄ being of particular interest. One of the potent strategies of greenhouse gas mitigations in livestock is dietary manipulation. Animal nutritionists are making effort to improve productivity while reducing the greenhouse gas footprint through either dietary supplementation or anaerobic digestion. This should also be the focus of equine nutritionist where efforts are made to reduce their environmental footprint.

Plant extract, yeast, dietary oil, essential oil, plant seed, and lipid supplementation are options available for CH₄ reduction. The ability of *Saccharomyces cerevisiae* to lower CH₄ is because of the ability to induce acetogens growth [7], which would aim at competing with methanogens for H₂. Oil influences greenhouse output through reduction of protozoa, serving as alternative for hydrogen sink (in the form of biohydrogenation), inhibition of the growth or activities of methanogens, and perhaps reduction of fiber digestibility [8].

Although the impact of plant extracts on foregut and hindgut fermentation parameters during manipulation is attributed to the bioactive compound [8], study has shown that medium chain fatty acids are effective tool in microbial manipulation. As a matter of fact, there are reports of microbial adaptation to plant extract, essential oil, and so on. However, there are limited, if any, on microbial adaptation to medium chain fatty acid especially the C-12:0 and C-14:0. Alternatively, the unsaturated fatty acid in oil could also serve as alternative hydrogen sink thereby reducing hydrogen available for methanogens. These fatty acids have a toxic effect on

protozoa and methanogens [9]. Lipid supplementation influences CH₄ reduction based on their fatty acid profile [10], especially the medium-chain fatty acid [11]. Soya bean oil and corn oil are examples of dietary oil that could be used, and they have both demonstrated their ability to reduce CH₄ in ruminant [12,13], which may be attributed to the unsaturated fatty acid, and protozoa reduction (which reduced hydrogen exchange with methanogens). The polyunsaturated fatty acids alter the fatty composition of cell membrane phospholipids of microbes [14] and disruption of the bilayer structure through the double bond shape of the molecules [15]. Other means include alteration in the ratio of acetate to propionate, saturation of the unsaturated fatty acid to saturated fatty acid [11,16]—otherwise known as biohydrogenation, which help to reduce hydrogen available for methanogenesis—and toxicity on gut microbes such as bacteria, methanogens, and protozoa [1] and reduces cell wall digestibility especially of fiber breakdown through toxicity to cellulolytic bacteria in roughage-based diet [17].

Little or no studies have evaluated the effect of soya oil, corn oil, and yeast on equine CH₄ production. The objective of the present study was to evaluate the effect of dietary inclusion with two sources of vegetable oils on the greenhouse gases emission as an option of the cleaner environment.

2. Materials and Methods

2.1. Substrate and Yeast Cultures

In the first trial, five total mixed rations (TMR) were formulated, as shown in Table 1, and used as incubation substrates.

Table 1
Diet ingredients and chemical composition.

Diets	Control	Corn Oil		Soybean Oil	
		Low	High	Low	High
Ingredients, %					
Oats	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Steam rolled corn	25.0	22.6	20.2	22.6	20.2
Steam rolled barley	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Wheat bran	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Corn gluten feed	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Soybean meal	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Type of oil	0.0	2.4	4.8	2.4	4.8
Molasses	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Vitamins/minerals	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Soybean hulls	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Chemical ration composition, %					
Dry matter	86.45	86.51	86.57	86.51	86.57
Crude fiber	9.43	9.37	9.31	9.37	9.31
Crude protein	13.4	13.18	12.97	13.18	12.97
Digestible energy, Mcal/kg ^a	3.38	3.5	3.63	3.5	3.62
Digestible crude protein, g/kg DM ^b	98.41	96.75	95.1	96.75	95.1
Ca	1.77	1.85	1.84	1.85	1.84
P	3.54	3.92	3.85	3.92	3.85
Mg	1.56	1.68	1.65	1.68	1.65
Na	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32
K	8.46	9.01	8.93	9.01	8.93
Cl	0.68	0.82	0.8	0.82	0.8
Zn	18.54	21.98	21.53	21.98	21.53
Cu	4.73	5.85	5.8	5.85	5.8
Fe	140.4	139.63	138.86	139.63	138.86
Oils Composition, per 100 g^c					
Energy, kcal		900		884	
Total fat, g		100		100	
Polyunsaturated fatty acids, g		47.7		60.71	
Monounsaturated fatty acids, g		33.6		24.28	
Saturated fatty acids, g		14.4		15	

^a Digestible energy (Mcal/kg) = (3.6 + 0.211Crude protein + 0.421 Ether extract + 0.015 Crude fibre)/4.184 [21].

^b Digestible crude protein (g/kg dry matter) = 4.49 + 0.8533 Crude protein [22].

^c Provided by the manufacturer Oléico Coral Internacional, SA de CV, San Luis Potosí, México.

Steam rolled corn was replaced with corn oil or soybean oil (Oléico; Coral Internacional SA de CV, San Luis Potosí, México) at 0% (control), 2.4% (low level), and 4.8% (high level) of TMR. Yeast culture (Procreatin 7; Safmex/Fermex SA de CV, Toluca, México) was used in powdered form, and it contained 1×10^{10} cell/g and added to each TMR at 0 and 4 mg/g dry matter (DM).

2.2. In Vitro Incubations

Before incubation begins, fecal contents (the inoculum source) were collected directly from the rectum of six adult English Thoroughbred horses at the Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico (aged 9–11 year and weighing 510 ± 20 kg) before the morning feeding. Horses were daily fed 1.5 kg twice a day of commercial concentrate (HORSE POWER Alimento Rolado para Caballo, ALPLA Mexico) and oat hay *ad libitum*. Fecal contents from individual horses were mixed to obtain a homogenized sample of feces of each treatment and mixed with the Goering and Van Soest [18] buffer solution without trypsinase in a ratio of 1:4 weight/volume. The incubation media after been mixed were strained through four layers of cheesecloth into a flask with an O₂-free headspace and used to inoculate three identical runs of incubation in 120-mL serum bottles containing 0.5 g of DM substrate.

A total of 90 bottles (two yeast doses \times three replicates \times three runs \times five substrates) plus three bottles without substrates and yeast as blanks were used. After filling all bottles, they were flushed with CO₂ and immediately closed with rubber stoppers, shaken, and placed on an incubator set at 39°C. Gas and CO₂ productions were recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, and 48 hours using the Pressure Transducer Technique (Extech Instruments, Waltham) of Theodorou et al [19]. At the same incubation period, CO₂, CH₄, and H₂ concentrations in the headspace of the bottles were measured using a diffusion-based gas detector (Air Quality Monitor YesAIR; Critical Environment Technologies Canada Inc, Delta, BC, Canada).

At the end of incubation after 48 hours, bottles were uncapped, and pH was measured using a digital pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico); the content of each bottle was filtered under vacuum through sintered glass crucibles (coarse porosity no. 1 pore size 100–160 μ m; Pyrex, Stone, UK) and incubation residues dried at 105°C overnight to estimate apparent DM degradability (DMD).

2.3. Chemical Analyses and Calculations

Samples of the TMR were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), N (#954.01), and ether extract (EE; #920.39) according to Association of Official Analytical Chemists [20].

Digestible energy (DE; Mcal/kg) was calculated as $DE = (3.6 + 0.211 \text{ crude protein [CP]} + 0.421 \text{ EE} + 0.015 \text{ crude fiber})/4.184$ [21].

Digestible crude protein (DCP; g/kg DM) was calculated as $DCP = 4.49 + 0.8533 \text{ CP}$ [22].

To estimate the kinetic parameters of gas production (GP), results of GP (mL/g DM) were fitted using the NLIN option of SAS [5] according to the equation of France et al [23] as:

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

where A is the volume of GP at time t, b is the asymptotic GP (mL/g DM), c is the rate of GP (per hour), and L (hour) is the discrete lag time before GP.

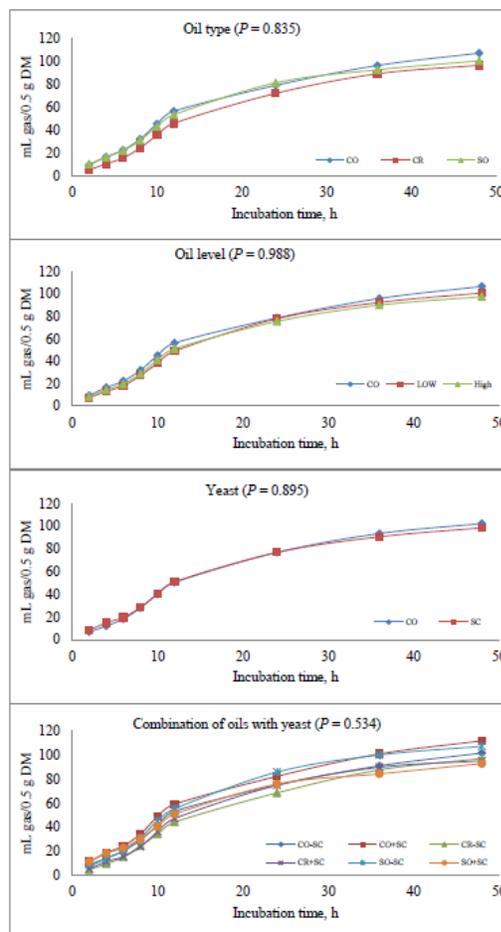


Fig. 1. Horse fecal total gas production (mL/0.5 g DM) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion of corn (CR) and soybean (SO) oils at 0% (CO, control), 2.4% (low), and 4.8% (high) of total diet as well as their combination without (–SC, 0 mg) or with (+SC, 4 mg) live yeast of *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per gram dry matter of diet).

2.4. Statistical Analyses

Data of each of the three runs within the same sample of each of the five individual samples of TMRs were averaged before statistical analysis. Mean values of each individual sample were used as the experimental unit. Results of *in vitro* GP and feces fermentation parameters were analyzed as a factorial experiment using the PROC GLM option of SAS [24] as:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + (R \times A)_{ij} + E_{ijk}$$

where Y_{ijk} is every observation of the i th TMR (R_i) with j th yeast dose (A_j), μ is the general mean, $(R \times A)_{ij}$ is the interaction between ration type and yeast dose, and E_{ijk} is the experimental error. Linear and quadratic polynomial contrasts were used to examine

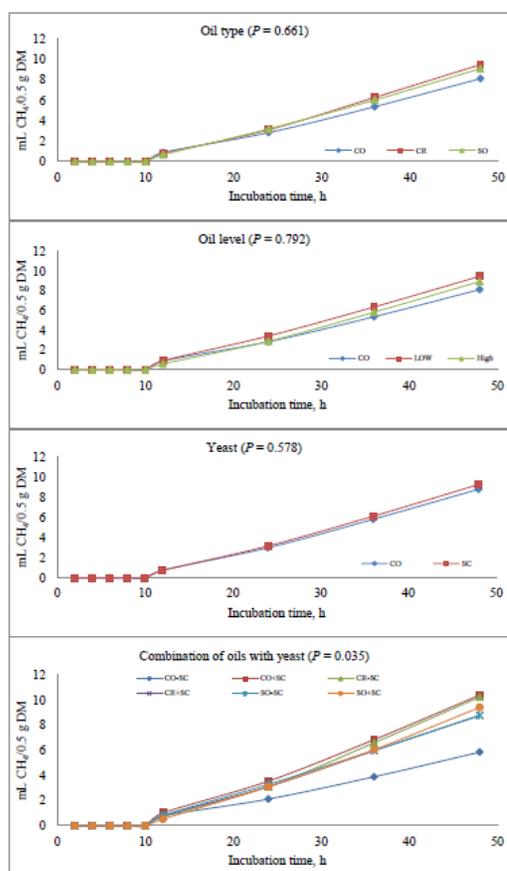


Fig. 2. Horse fecal methane (CH_4) production (mL/0.5 g DM) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion of corn (CR) and soybean (SO) oils at 0% (CO, control), 2.4% (low), and 4.8% (high) of total diet as well as their combination without (–SC, 0 mg) or with (+SC, 4 mg) live yeast of *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per gram dry matter of diet).

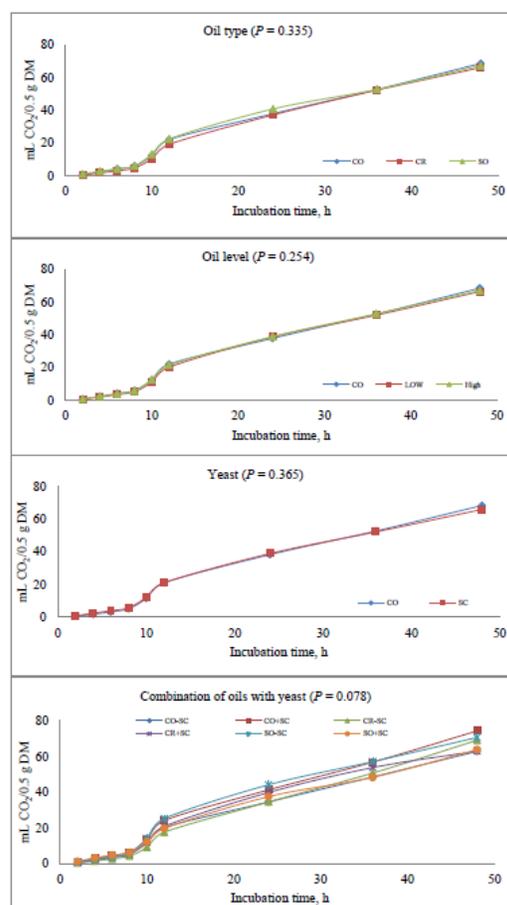


Fig. 3. Horse fecal carbon dioxide (CO_2) production (mL/0.5 g DM) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion of corn (CR) and soybean (SO) oils at 0% (CO, control), 2.4% (low), and 4.8% (high) of total diet as well as their combination without (–SC, 0 mg) or with (+SC, 4 mg) live yeast of *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per gram dry matter of diet).

responses to increasing addition levels of test (steam rolled corn replacement and yeast doses). Statistical significance was declared at $P < .05$.

3. Results

3.1. In Vitro Gas Kinetics

Fig. 1 shows that oil type (OT), oil level (OL), yeast, and the interaction between them had no significant effect ($P > .05$) on the asymptomatic GP and the rate of GP. Lag time for asymptomatic GP was influenced ($P = .048$) by OL. There was decrease in lag time required for asymptomatic total GP when high level of oil was used. Treatment had no effect ($P > .05$) on asymptomatic CH_4 GP and lag time (Fig. 2). In addition, asymptomatic production of H_2 and CO_2 was not influenced ($P > .05$) by OT, OL, yeast, and their interaction (Figs. 3 and 4). The interaction of OT \times OL influenced ($P = .032$) the

lag time of CO_2 production. Furthermore, high level of corn oil resulted in the highest delay, whereas the soybean oil resulted in quick production of CO_2 gas (Fig. 1, Table 2).

3.2. Fecal Fermentation Parameters

The use of OL and *S. cerevisiae* (SC) had impact ($P < .05$) on the pH during fermentation were observed. The inclusion of soybean oil and the presence of SC resulted in increase in the pH level. Interaction of OT \times OL ($P = .017$) and OT \times SC ($P = .022$) had impact on the DMD. Inclusion of corn oil without yeast resulted in the highest DMD, whereas the lowest ($P < .05$) value was obtained when SC was added to corn oil. Furthermore, the highest DMD was recorded in substrate that had low corn oil inclusion, whereas digestibility decreased ($P < .05$) when high level of corn oil was used.

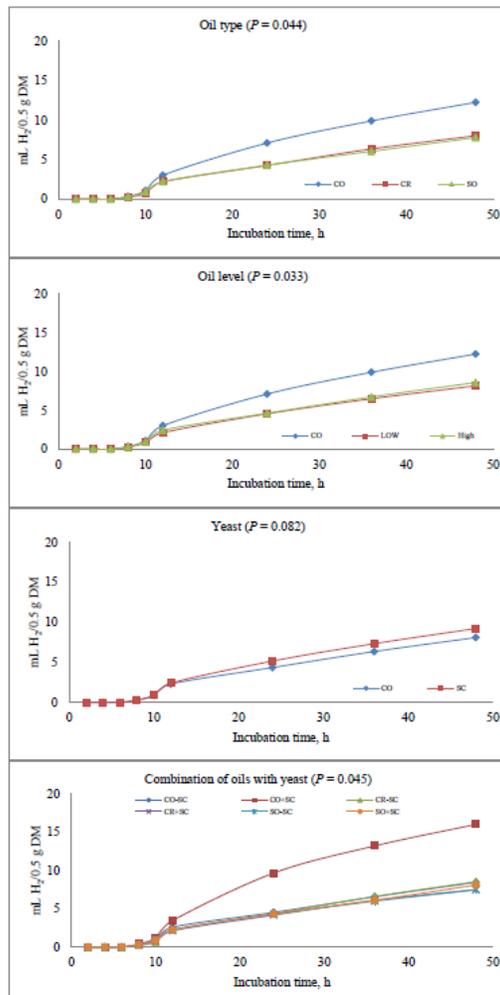


Fig. 4. Horse fecal hydrogen (H_2) production (mL/0.5 g DM) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion of corn (CR) and soybean (SO) oils at 0% (CO, control), 2.4% (low), and 4.8% (high) of total diet as well as their combination without (–SC, 0 mg) or with (+SC, 4 mg) live yeast of *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per g dry matter of diet).

However, high soybean oil with SC was an exception because of its high DMD, which was closest to the highest ($P < .05$) DMD in low corn oil without yeast. Conversely, GP production/DM degraded at 8, 12, 24, and 48 hours was influenced ($P < .05$) by OT and their interaction (OT \times OL). The OT and OT \times OL increased ($P < .05$) the GP/DM degraded at 8, 12, and 24 hours (Table 3).

3.3. Fecal CH_4 Production

The OL \times SC had no significant effect ($P > .05$) on CH_4 production/DM incubated. Conversely, low corn oil with the inclusion of

SC produced the highest CH_4 , whereas high corn oil with the inclusion of SC produced the least CH_4 . Still, the lowest value was obtained with OT \times OL. The lowest CH_4 value during 24 hours incubation was obtained with the inclusion of high level of corn oil, whereas the highest value was obtained with low corn oil. At 48 hours, the lowest value for CH_4 production/DM degraded was obtained with high level of corn oil, whereas the highest value was with the addition of high soybean oil. The OT, OL, SC, and their interaction had no effect ($P > .05$) on proportional CH_4 production (Table 4).

3.4. Fecal CO_2 Production

There is no effect ($P > .05$) of OL \times OT on the CO_2 produced during incubation for 8, 12, 24, and 48 hours. The effect ($P = .039$) of OT was observed in mL CO_2 /0.5 g DM degraded at 8 hours of incubation. Corn oil produced the lowest, whereas soybean oil the highest ($P < .05$) value obtained from CO_2 /0.5 g DM degraded at 8 hours. The OT \times OL showed increasing ($P < .05$) volume of CO_2 /DM degraded with time increased from 8 to 24 hours of incubation. However, high corn oil produced the least, whereas high soybean oil produced the highest CO_2 production/DM degraded. In contrast, OT, OL, SC, and their interaction had no significant ($P > .05$) effect on the proportional CO_2 during the 48 hours of *in vitro* fermentation (Table 5).

3.5. Fecal Hydrogen (H_2) Production

The OT, OL, SC, and their interaction had no effect ($P > .05$) on the fecal H_2 production. However, OT had influence ($P = .048$) on H_2 production/DM degraded for 8 hours, but no significant effect at 12, 24, and 48 hours of incubation. Inclusion of corn oil decreased ($P < .05$) the volume of H_2 /DM degraded at 8 hours of incubation, whereas H_2 /DM incubated increased ($P < .05$) during the 48 hours of fermentation (Table 6).

4. Discussion

Until now, there is not much concern on the need to reduce CH_4 emission from equine. This may be partly due to the fact that the main CH_4 sink in equine is acetogenesis rather than methanogenesis, which made equine emit less CH_4 compared with other herbivores with four-compartment stomach.

Lag time is a measure of the time required for feed digestibility by gut microbes to initiate digestibility. It is important to know that digestibility is an indication of adaptability of microbes to the digesta and the environment, which is an evidence of favorable substrate and environment. The result showed that the high OL created an environment, which is favorable to hence the lower time for, required for GP. This GP indicates that high oil could help animals to have access to nutrient from feed within a short period. Furthermore, high level of corn oil had the highest lag time required for CO_2 production, which is one of the constituents of greenhouse gases for global warming. Contrariwise, high soybean oil had the least delay in producing CO_2 . This implies that soybean oil had lower CO_2 inhibiting ability, whereas corn oil could inhibit it better. However, this does not give a better picture. A look at CO_2 showed that although high corn oil had delay in CO_2 production, it actually produced more CO_2 compared with high level of soybean oil, which had the quicker CO_2 production. This means that, on the long term, the microbes in corn oil diet adapted to the oil and produced more gas while the soybean oil inhibited CO_2 despite quick rate of production of gas [25–27]. This points to the inherent ability of soybean oil to reduce CO_2

Table 2

Effect of corn and soybean oils in combination with (+, 4 mg) or without (–, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per gram DM of diet) at low (2.4%) and high (4.8%) levels (percentage of the diet) as feed additives on *in vitro* fecal total gas, CH₄, CO₂, and H₂ kinetics^a of a total mixed rations fed to horses.

OT	OL	SC	Total Gas			CH ₄			CO ₂			H ₂		
			b	c	Lag	b	c	Lag	b	c	Lag	b	c	Lag
Control	0	–	96.6	0.060	2.77	8.6	0.209	15.47	62.8	0.036	6.87	8.23	0.036	9.58
		+	107.3	0.046	2.12	11.4	0.037	17.18	76.7	0.033	7.17	15.51	0.059	10.07
Corn oil	Low	–	88.5	0.065	3.21	10.2	0.044	14.79	66.5	0.036	7.66	6.01	0.038	9.45
		+	103.5	0.053	3.84	14.8	0.037	17.89	70.3	0.039	8.24	9.04	0.039	10.52
	High	–	99.9	0.032	2.26	12.4	0.037	17.53	87.0	0.026	14.88	10.87	0.035	12.30
		+	81.5	0.047	2.38	3.8	0.029	14.02	52.8	0.066	7.99	5.52	0.079	10.45
Soybean oil	Low	–	91.3	0.048	5.02	6.9	0.041	15.43	57.2	0.038	9.53	6.51	0.039	11.20
		+	96.0	0.057	1.14	10.6	0.023	16.78	71.6	0.049	7.34	6.22	0.036	9.37
	High	–	117.0	0.057	1.48	12.2	0.035	17.89	78.1	0.061	6.70	8.05	0.042	7.73
		+	82.5	0.058	1.06	10.2	0.036	18.48	58.3	0.052	6.26	9.64	0.038	9.54
Pooled SEM			20.56	0.0131	1.043	4.16	0.1970	2.154	16.15	0.0132	1.733	6.505	0.0241	1.167
Additive effect ^b														
OT			0.819	0.529	0.317	0.913	0.985	0.479	0.805	0.383	0.076	0.956	0.596	0.147
OL			0.979	0.439	0.048	0.737	0.989	0.623	0.817	0.240	0.534	0.734	0.551	0.875
SC			0.807	0.773	0.155	0.859	0.600	0.512	0.797	0.308	0.120	0.581	0.306	0.993
OT × SC			0.653	0.876	0.094	0.628	0.998	0.702	0.588	0.278	0.457	0.845	0.460	0.821
OT × OL			0.698	0.184	0.684	0.249	0.971	0.391	0.922	0.835	0.032	0.845	0.643	0.074
OL × SC			0.219	0.615	0.325	0.114	0.975	0.234	0.122	0.658	0.251	0.726	0.563	0.829

Abbreviations: DM, dry matter; OL, oil level; OT, oil type; SEM, standard error of the mean.

^a b is the asymptotic gas production (mL/g DM); c is the rate of gas production (per hour); Lag is the initial delay before gas production begins (h).

^b The P value of the interaction among the three experimental factors (OT × OL × SC) was no significant (P > .5) for all the measured parameters.

production than corn oil. Hence, as far as greenhouse gas emission in livestock is concerned, the time required for producing this may not be an absolute correct measurement of the impact of the additives, rather, than what quantity were they able to inhibit because initial delay may be because of adaptation rather than inhibition [26–28].

The low pH with inclusion of low corn oil is a further attestation of digestibility, which would have resulted in increased volatile fatty acids production [29]. Conversely, GP/DM degraded showed that OT and OT × OL affected the gas produced within 24 hours. Highest GP was recorded when high level of soybean oil was used, whereas the lowest was gas produced when high corn

oil was used. This implied that high level of soybean oil increased digestibility, and it created an enabling microbial environment that favored digestibility [30]. Consequently, high level of soybean oil was not toxic to the microbes, and they were able to adapt to it to favor organic matter digestibility and cell wall carbohydrate digestibility [31].

Neither OT nor OL had influence (P > .05) on CH₄ production; However, OT × OL led to the production of lower CH₄. High level of corn oil produced the least CH₄, whereas low level of corn oil produced the highest in 12 and 24 hours of incubation. It may be agreed upon that high level of corn oil is toxic to the methanogens (antimethanogens) and hydrogen-producing

Table 3

Effect of corn and soybean oils in combination with (+, 4 mg) or without (–, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per gram DM of diet) at low (2.4%) and high (4.8%) levels (percentage of the diet) as feed additives on *in vitro* fecal fermentation parameters as well as total gas production at different hours of incubation of a total mixed ration fed to horses.

OT	OL	SC	Fermentation Parameters		Gas Production mL/0.5 DM Incubated				Gas Production mL/0.5 DM Degraded			
			pH	DMD	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	–	6.5	19.7	29.3	53.3	75.1	102.0	11.4	21.1	30.2	41.1
		+	6.6	21.1	34.4	59.2	82.5	112.2	14.6	25.0	34.8	46.7
Corn oil	Low	–	6.5	44.2	27.7	48.5	73.9	94.6	10.2	17.5	27.7	35.1
		+	6.6	19.0	24.5	50.6	83.8	109.0	9.7	19.8	32.5	42.0
	High	–	6.5	19.3	21.4	39.9	63.4	100.3	8.1	14.6	22.7	36.7
		+	6.6	14.8	22.8	43.8	66.3	82.0	6.1	12.3	17.4	21.0
Soybean oil	Low	–	6.6	19.5	20.5	38.6	69.9	94.4	8.3	15.7	28.7	38.9
		+	6.7	19.3	30.9	51.3	83.7	100.9	12.4	20.4	33.5	40.4
	High	–	6.6	18.7	41.5	72.3	102.1	120.7	15.4	26.9	37.7	44.9
		+	6.7	34.8	29.9	50.5	68.3	85.3	20.3	34.4	48.0	63.2
Pooled SEM			0.09	6.46	6.63	10.76	17.84	21.66	3.32	5.49	8.98	11.68
Additive effect ^a												
OT			0.045	0.789	0.169	0.333	0.470	0.801	0.023	0.039	0.069	0.119
OL			0.989	0.435	0.529	0.568	0.825	0.865	0.319	0.350	0.892	0.780
SC			0.041	0.561	0.790	0.835	0.929	0.813	0.252	0.273	0.425	0.574
OT × SC			0.925	0.017	0.978	0.621	0.520	0.684	0.233	0.434	0.539	0.394
OT × OL			0.677	0.022	0.145	0.121	0.380	0.604	0.033	0.028	0.094	0.154
OL × SC			0.799	0.051	0.357	0.289	0.286	0.231	0.938	0.905	0.856	0.861

Abbreviations: DM, dry matter; DMD, DM degradability; OL, oil level; OT, oil type; SEM, standard error of the mean.

^a The P value of the interaction among the three experimental factors (OT × OL × SC) was no significant (P > .5) for all the measured parameters.

Table 4

Effect of corn and soybean oils in combination with (+, 4 mg) or without (–, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per gram DM of diet) at low (2.4%) and high (4.8%) levels (percentage of the diet) as feed additives on *in vitro* fecal methane (CH₄) production at different hours of incubation^a of a total mixed ration fed to horses.

OT	OL	SC	mL CH ₄ /0.5 DM Incubated			mL CH ₄ /0.5 g DM Degraded			Proportional CH ₄ Production		
			12	24	48	12	24	48	12	24	48
Control	0	–	0.77	2.12	5.86	0.30	0.84	2.34	1.35	2.68	5.34
		+	1.02	3.55	10.40	0.45	1.53	4.33	1.78	4.46	9.55
Corn oil	Low	–	1.05	3.61	9.62	0.39	1.46	3.94	2.00	4.10	8.10
		+	0.88	4.40	13.57	0.37	1.71	5.16	1.57	5.23	12.57
	High	–	0.39	2.62	10.87	0.14	0.95	4.08	1.00	4.50	11.50
		+	0.69	1.82	3.96	0.12	0.37	0.92	1.43	2.47	4.53
Soybean oil	Low	–	1.03	2.85	6.37	0.42	1.17	2.65	2.11	4.17	7.97
		+	0.68	3.40	9.66	0.26	1.34	3.79	1.27	3.60	8.27
	High	–	0.61	3.74	11.23	0.24	1.39	4.14	0.90	3.70	9.30
		+	0.37	2.82	9.19	0.20	1.74	5.99	0.73	4.07	10.73
Pooled SEM			0.445	1.066	3.185	0.185	0.466	1.369	0.667	0.901	2.283
Additive effect ^b											
OT			0.800	0.909	0.861	0.820	0.395	0.527	0.603	0.768	0.948
OL			0.219	0.287	0.662	0.171	0.359	0.913	0.137	0.358	0.898
SC			0.971	0.542	0.552	0.973	0.355	0.306	0.887	0.505	0.378
OT × SC			0.569	0.906	0.643	0.772	0.527	0.210	0.596	0.788	0.517
OT × OL			0.913	0.207	0.165	0.617	0.070	0.052	0.751	0.360	0.200
OL × SC			0.645	0.315	0.080	0.835	0.624	0.349	0.421	0.387	0.119

Abbreviations: DM, dry matter; OL, oil level; OT, oil type; SEM, standard error of the mean.

^a No methane production detected before 12 hr of incubation.

^b The *P* value of the interaction among the three experimental factors (OT × OL × SC) was no significant (*P* > .5) for all the measured parameters.

microbes or perhaps as reported in [8] medium chain C12:0 and C14:0 are toxic to protozoa. This toxicity to protozoa might have reduced the hydrogen available for CH₄ formation by methanogens [8].

Furthermore, OT × OL–dependent decrease was observed in CO₂ production/DM degraded. High level of corn oil produced the least, which is contrary to the highest produced under the high of soybean oil in 24 hours. The CO₂ produced when high level of soybean oil used was 2.55-fold higher than what was produced by the high corn oil inclusion. On the one hand, this could mean that high corn oil enhances more CO₂ available for volatile fatty acid production thereby making energy more available to equine

[32,33]. However, it could be that high corn oil reduced digestibility, hence low CO₂ availability. The second option seems reasonable because data show that high corn oil produced the lowest DMD.

One of the functions of yeast in livestock gut is pH stability; it was observed that yeast had no significant effect (*P* > .05) on the GP, CH₄, CO₂, and H₂. Inclusion of yeast helped to increase the pH during fermentation [26,27,34]. Increase in pH or stability is one of the benefits of yeast in livestock. They help to buffer the internal environment to reduce the impact of acidity by neutralization [35]. This is agreement with the study of Elghandour et al [36] that yeast aids increase in gut pH. The increase in pH could be as a result of the

Table 5

Effect of corn and soybean oils in combination with (+, 4 mg) or without (–, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per g DM of diet) at low (2.4%) and high (4.8%) levels (percentage of the diet) as feed additives on *in vitro* fecal carbon dioxide (CO₂) production at different hours of incubation of a total mixed ration fed to horses.

OT	OL	SC	mL CO ₂ /0.5 DM Incubated				mL CO ₂ /0.5 g DM Degraded				Proportional CO ₂ Production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	–	5.55	20.09	34.47	62.81	2.15	7.97	13.89	25.35	19.54	37.87	45.94	61.78
		+	6.37	24.04	41.23	74.27	2.66	9.96	17.04	30.30	19.17	40.42	49.23	65.64
Corn oil	Low	–	4.61	20.06	40.38	68.80	1.70	7.33	15.35	25.87	17.33	41.67	53.00	71.00
		+	6.18	21.64	43.47	70.52	2.51	8.60	17.23	27.41	22.67	41.27	51.27	65.23
	High	–	3.89	14.95	28.50	69.30	1.44	5.45	10.21	25.63	17.67	36.67	44.00	71.00
		+	4.40	19.95	36.00	55.38	1.10	5.50	9.39	14.42	19.67	45.67	55.00	68.20
Soybean oil	Low	–	3.69	17.82	35.49	57.93	1.50	7.25	14.49	23.90	18.33	40.67	46.00	57.53
		+	5.72	19.57	36.40	66.35	2.25	7.68	14.41	26.55	19.67	40.67	47.57	65.90
	High	–	8.06	32.53	52.67	83.25	3.05	12.14	19.55	31.26	20.00	43.67	50.67	68.33
		+	6.61	19.86	38.47	61.07	5.01	15.22	30.37	49.49	22.33	39.73	56.07	69.73
Pooled SEM			1.452	5.290	10.570	16.234	0.838	2.877	5.880	9.497	3.826	5.117	6.192	6.984
Additive effect ²														
OT			0.232	0.384	0.626	0.921	0.039	0.066	0.117	0.167	0.783	0.971	0.866	0.485
OL			0.507	0.587	0.997	0.907	0.272	0.365	0.632	0.529	0.878	0.920	0.655	0.379
SC			0.372	0.890	0.793	0.891	0.126	0.362	0.350	0.508	0.382	0.573	0.260	0.723
OT × SC			0.717	0.250	0.429	0.973	0.349	0.789	0.564	0.262	0.737	0.392	0.896	0.359
OT × OL			0.067	0.153	0.204	0.455	0.016	0.039	0.048	0.114	0.522	0.855	0.299	0.558
OL × SC			0.277	0.467	0.723	0.320	0.980	0.862	0.625	0.917	0.831	0.708	0.350	0.841

Abbreviations: DM, dry matter; OL, oil level; OT, oil type; SEM, standard error of the mean.

Means in the same column with different superscripts differ (*P* < .05).

² The *P* value of the interaction among the three experimental factors (OT × OL × SC) was no significant (*P* > .5) for all the measured parameters.

Table 6
Effect of corn and soybean oils in combination with (+, 4 mg) or without (–, 0 mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC; per g DM of diet) at low (2.4%) and high (4.8%) levels (percentage of the diet) as feed additives on *in vitro* fecal hydrogen (H₂) production at different hours of incubation of a total mixed ration fed to horses.

OT	OL	SC	mL H ₂ /0.5 DM Incubated				mL H ₂ /0.5 g DM Degraded				Proportional H ₂ Production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	–	0.29	2.59	4.52	8.45	0.11	1.00	1.78	3.35	1.00	5.17	6.25	8.42
		+	0.41	3.45	9.66	16.02	0.17	1.44	4.52	7.38	1.17	6.00	11.67	14.92
Corn oil	Low	–	0.28	1.69	3.32	6.15	0.10	0.59	1.22	2.25	1.00	3.67	4.67	6.67
		+	0.25	2.40	4.97	9.22	0.10	0.89	1.84	3.42	1.00	5.00	6.33	9.00
	High	–	0.21	2.78	5.39	10.94	0.08	0.97	1.87	3.85	1.00	6.33	7.67	10.33
		+	0.23	1.84	3.37	5.78	0.06	0.58	0.98	1.60	1.00	4.33	5.33	7.33
Soybean oil	Low	–	0.21	1.63	3.52	6.55	0.08	0.66	1.43	2.68	1.00	3.67	4.67	6.67
		+	0.31	1.83	3.80	6.60	0.12	0.73	1.54	2.66	1.00	3.67	4.67	6.67
	High	–	0.42	2.79	5.01	8.40	0.15	1.01	1.82	3.08	1.00	4.00	5.00	7.00
		+	0.30	2.64	4.82	9.61	0.20	1.98	3.85	8.20	1.00	5.33	7.33	11.33
Pooled SEM			0.090	0.729	4.717	6.908	0.039	0.360	2.614	3.405	0.121	1.317	5.660	6.294
Additive effect ²														
OT			0.308	0.931	0.994	0.962	0.048	0.188	0.715	0.624	1.000	0.478	0.885	0.932
OL			0.641	0.231	0.825	0.752	0.392	0.108	0.738	0.610	1.000	0.290	0.757	0.720
SC			0.554	0.579	0.569	0.580	0.188	0.132	0.426	0.380	0.458	0.613	0.541	0.494
OT × SC			0.982	0.895	0.972	0.865	0.304	0.269	0.747	0.583	1.000	0.594	0.852	0.798
OT × OL			0.280	0.489	0.879	0.858	0.065	0.138	0.695	0.583	1.000	1.000	0.951	0.878
OL × SC			0.496	0.341	0.757	0.720	0.952	0.841	0.955	0.878	1.000	0.594	0.918	0.959

Abbreviations: DM, dry matter; OL, oil level; OT, oil type; SEM, standard error of the mean.

Means in the same column with different superscripts differ ($P < .05$).

² The P value of the interaction among the three experimental factors (OT × OL × SC) was no significant ($P > .5$) for all the measured parameters.

ability of yeast decrease the lactic acid or increase the lactic acid using bacteria [26,37].

Lipid supplementation is a method of manipulating fermentative environment for digestibility and production improvement. One of the main functions of lipid supplementation has been attributed to their fatty acid chain. Medium chain fatty acid and polyunsaturated fatty acids rather than bioactive compound are associated with their function. Furthermore, Marounek et al [22] and Abubakr et al [8] have both attributed the toxicity of the fatty acid to bacteria and protozoa. Corn oil without yeast inclusion led to the highest DMD, an indication of the degree of organic matter breakdown by microorganism and an adaptation to the environment or favorable environment. Corn oil was not toxic to the microbes or microbial adaption. This implies that microbes can readily adapt when the oil is used without being toxic to them compared with soybean oil or high level of corn oil [26]. The increase in DMD also has positive and beneficial implication for volatile fatty acids and energy availability for the animals [27]. Breakdown of cell wall is essential for nutrient assessment, hence the use of low corn oil without yeast or alternatively, and high soybean oil with yeast could be used to increase DMD without disrupting the gut pH and thereby reducing incidence of acidosis.

5. Conclusions

There is no one fit all solution to the problems such as digestibility and greenhouse gas emission in livestock production. To enhance time required for digestion, which is an indication of microbial adaptation, high level of soybean oil may be used to reduce the time required by microbes for digestibility. Inclusion of soybean oil with yeast would help to increase and stabilize gut pH thereby reducing incidence of microbial disruption. Greenhouse gases emission in equine may be reduced by supplementing equine diet with high level of corn oil to reduce the emission of equine by 44.5, 36.0, and 54.6% for CH₄, CO₂ and H₂, respectively. However, for combined performance, such as digestibility, pH, and greenhouse gases emission reduction, soybean oil may be recommended.

References

- [1] Elghandour MMY, Adegbeye MJ, Barabosa-Pilego A, Perez NR, Hernandez SR, Zaragoza-Bastida A, Salem AZM. Equine contribution in methane emission and its mitigation strategies. *J Equine Vet Sci* 2019;72:56–63.
- [2] Johnson DE, Ward GM. Estimates of animal methane emissions. *Environ Monit Assess* 1996;42:133–41.
- [3] Moeletsi ME, Tongwane MI, Tsubo M. Enteric methane emissions estimate for livestock in South Africa for 1990 to 2014. *Atmosphere* 2017;8:69.
- [4] Gerber P, MacLeod M, Opio C, Vellinga T, Falcucci A, Weiler V, et al. Greenhouse gas emissions from livestock food chains: a global assessment. *Bra-tislava: EAAP*; 2012.
- [5] INEGI. Censo Agropecuario. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal Méx.:Ags. INIA Biblioteca Digital; 2009. p. 150.
- [6] Domínguez-Vara IA, Sánchez-Malváez E, Medina-Navarro P, de Oca-Jiménez RM, Vieyra Alberto R, Morales-Almaraz E, de la Fuente JL, Sánchez-Torres JE, Bórquez-Gastelum JL, Acosta-Dibarrat J, Salem AZM. Mineral status and interrelationship in soil, forage, and blood serum of horses in the rainy and dry seasons. *J Equine Vet Sci* 2017;49:101–7.
- [7] Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HP, Adesogan AT, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: a review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci* 2013;91:5045–69.
- [8] Abubakr AR, Alimon AR, Yaakub H, Abdullah N, Ivan M. Digestibility, rumen protozoa, and ruminal fermentation in goats receiving dietary palm oil by-products. *J Saudi Soc Agric Sci* 2012;12:147–54.
- [9] McAllister TA, Okine EK, Mathison GW, Cheng KJ. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canad J Anim Sci* 1996;76:231–43.
- [10] O'Connor CI, Lawrence LM, Lawrence AC, Janicki KM, Warren LK, Hayes S. The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J Anim Sci* 2004;82:2978–84.
- [11] Martin C, Morgavi DP, Doreau M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 2010;4:351–65.
- [12] Wang M, Jing Y, Liu S, Gao J, Shi L, Vercoe P. Soybean oil suppresses ruminal methane production and reduces content of coenzyme F₄₂₀ *in vitro* fermentation. *Anim Prod Sci* 2016;56:627–33.
- [13] Winders TM, Boyd BM, Hilscher FH, Stowell RR, Fernando SC, Erickson GE. Evaluation of the effect of corn oil on methane production in finishing cattle. *J Anim Sci* 2018;96:231–2.
- [14] Keweloh H, Heipieper HJ. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* 1996;31:129–37.
- [15] Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids 1,2. *J Nutr* 2012;14:592–9.
- [16] Nevel CJ, Demeyer DI. Control of rumen methanogenesis. *Envt Monit Assess* 1996;42:73–97.
- [17] Nagaraja TG, Newbold CJ, Van Nevel CJ, Demeyer DI. Manipulation of rumen fermentation. Dordrecht: Springer; 1997.
- [18] Goering MK, Van Soest PJ. Forage fibre analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC: Agricultural Research Service, USDA; 1970.

- [19] Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1994;48:185–97.
- [20] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official methods of analysis*. 16th ed. Arlington, VA: AOAC; 1997.
- [21] NRC. *Nutrient requirements of horses*. 6th ed. Washington, DC: National Academy Press; 2007.
- [22] Marounek M, Skrivanová V, Savka O. Effect of caprylic, capric and oleic acid on growth of rumen and rat caecal bacteria. *J Anim Feed Sci* 2002;11:507–16.
- [23] France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, López S, Bannink A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Br J Nutr* 2000;83:143–50.
- [24] SAS. *User's guide: statistics*, version 9.0. Cary, NC: SAS Institute; 2002.
- [25] Parra-García A, Salem AZM, Elghandour MMY, Camacho LM, Odongo NE. Potential impact of prickly pear cactus flour and *Salix babylonica* extract on cecal fermentation and methane production in horses. *Agroforest Syst* 2018;92:1145–54.
- [26] Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, Olafadehan OA, Kholif AM. Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. *J Clean Prod* 2016;139:1362–9.
- [27] Elghandour MMY, Vallejo LH, Salem AZM, Salem MZM, Camacho LM, Buendía GR, et al. Effects of *Schizochytrium microalgae* and sunflower oil as sources of unsaturated fatty acids for the sustainable mitigation of ruminal biogases methane and carbon dioxide. *J Clean Prod* 2017;168:1389–97.
- [28] Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutierrez CG. *In vitro* ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses combined with forages and their effect on glucose and insulin blood plasma concentrations after an oral drench in sheep. *Anim Feed Sci Technol* 2016;123:74–80.
- [29] Velázquez AE, Kholif AE, Elghandour MMY, Salem AZM, de Oca Jiménez R, Pliego AB, et al. Effect of partial replacement of steam rolled corn with soybean hulls or prickly pear cactus in the horse's diet in the presence of live *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* fecal gas production. *J Equine Vet Sci* 2016;42:94–101.
- [30] Vallejo L, Salem AZM, Kholif A, Elghandour M, Fajardo R, Rivero N, Bastida A, Mariezcurrena M. Influence of cellulase or xylanase on the *in vitro* rumen gas production and fermentation of corn stover. *Indian J Anim Sci* 2016;86:70–4.
- [31] Hernández A, Kholif AE, Lugo-Coyote R, Elghandour MMY, Cipriano M, Rodríguez GB, et al. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J Clean Prod* 2017;142:2384–92.
- [32] Hernandez A, Kholif AE, Elghandour MMY, Camacho LM, Cipriano MM, Salem AZM, et al. Effectiveness of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. *J Clean Prod* 2017;148:616–23.
- [33] Mohammadabadi T, Shakarami MH, Elghandour MMY, Salem AZM, Monroy JC. Effect of Natuzyme enzyme on fecal digestion and fermentation of wheat straw and alfalfa hay in Arabian horses. *J Equine Vet Sci* 2018;70:13–7.
- [34] Weese JS. Microbial evaluation of commercial probiotics. *J AM Vet Med Assoc* 2002;220:794–7.
- [35] Salem AZM, Elghandour MMY, Kholif AE, Barbabosa A, Camacho LM, Odongo NE. The effect of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count and *in vitro* fecal fermentation. *J Equine Vet Sci* 2015;39:12–9.
- [36] Elghandour MMY, Mellado M, Kholif AE, Salem AZM, Barbabosa A, Ballinas S. Fecal gas production of ten common horse feeds supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Equine Vet Sci* 2016;47:1–8.
- [37] Giron JEP, Restrepo MLP, Carulla JEP, Fornaguera. Supplementation with corn oil and palm kernel oil to grazing cows: ruminal fermentation, milk yield, and fatty acid profile. *R Bras Zootec* 2016;45:693–703.

7.1.1 Cinética del gas *in vitro*

La Figura 1 muestra que el tipo de aceite, el nivel de aceite, la levadura y la interacción entre ellos no tuvieron un efecto significativo ($P>0,05$) sobre la producción de gas asintomático y la tasa de producción de gas. El tiempo de retraso para la producción de gas asintomático fue influenciado ($P=0,048$) por el nivel de aceite (es decir, OL). El tiempo necesario para la producción total de gas asintomático disminuyó cuando se utilizó un nivel alto de aceite. El tratamiento no tuvo ningún efecto ($P>0,05$) sobre la producción asintomática de gas metano y el tiempo de retardo (Figura 2). Además, la producción asintomática de H_2 y CO_2 no se vio influida ($P>0,05$) por el tipo de aceite, el nivel de aceite, la levadura y su interacción (Figuras. 2 y 3). La interacción del tipo de aceite (OT) x el nivel de aceite (OL) influyó ($P=0,032$) en el tiempo de retardo de la producción de CO_2 . Además, el nivel alto de aceite de maíz dio lugar al mayor retraso, mientras que el aceite de soya dio lugar a una rápida producción de gas CO_2 (Figura 1, Tabla 2).

7.1.2 Parámetros de fermentación fecal

Se observó que el uso de OL y *S. cerevisiae* (SC) tuvo impacto ($P<0,05$) en el pH durante la fermentación. La inclusión de aceite de soya y la presencia de SC dieron lugar a un aumento del nivel de pH. La interacción de OT x OL ($P=0,017$), OT x SC ($P=0,022$) tuvo impacto en la digestibilidad de la materia seca (DMS). La inclusión de aceite de maíz sin levadura dio lugar a la mayor DMS, mientras que el valor más bajo ($P<0,05$) se obtuvo cuando se añadió SC al aceite de maíz. Además, la mayor DMS se registró en el sustrato con baja inclusión de aceite de maíz, mientras que la digestibilidad disminuyó ($P<0,05$) cuando se utilizó un alto nivel de aceite de maíz. Sin embargo, el aceite de soja alto con SC fue una excepción, debido a su alta DMS, que se acercó a la más alta ($P<0,05$) DMS en el aceite bajo de maíz, sin levadura. Por el contrario, la producción de gas/MS degradado a las 8, 12, 24 y 48 h estuvo influenciada ($P<0,05$) por la OT y su interacción (OT x OL). La OT, y (OT x OL) aumentaron ($P<0,05$) la producción de gas/MS degradado a las 8 y 12 y 24h (Tabla 3).

7.1.3 Producción de metano fecal (CH₄)

El OL x SC no tuvo un efecto significativo ($P>0,05$) sobre la producción de CH₄/MS incubado. Por el contrario, el aceite de maíz bajo con la inclusión de SC produjo el mayor metano mientras que el aceite de maíz alto con la inclusión de SC produjo el menor CH₄. El valor más bajo se obtuvo con OT x OL. El valor más bajo de metano durante 24h de incubación se obtuvo con la inclusión de un nivel alto de aceite de maíz mientras que el valor más alto se obtuvo con un nivel bajo de aceite de maíz. A las 48h, el valor más bajo de producción de CH₄/MS degradado se obtuvo con el nivel alto de aceite de maíz mientras que el valor más alto fue con la adición de aceite de soja alto. El OT, OL, SC y su interacción no tuvieron efecto ($P>0,05$) sobre la producción proporcional de CH₄ (Tabla 4).

7.1.4 Producción de dióxido de carbono (CO₂) fecal

No hay efecto ($P>0,05$) de OL x OT sobre el CO₂ producido durante la incubación durante 8, 12, 24 y 48h. El efecto ($P=0,039$) de OT se observó en ml CO₂/0,5g MS degradada a las 8 h de incubación. El aceite de maíz produjo el valor más bajo mientras que el aceite de soja el más alto ($P<0,05$) obtenido de CO₂/0,5g de MS degradado a las 8h. El OT x OL mostró un volumen creciente ($P<0,05$) de CO₂/MS degradado con el aumento del tiempo de 8 a 24 h de incubación. Sin embargo, el aceite de maíz alto fue el que menos produjo, mientras que el aceite de soja alto produjo la mayor producción de CO₂/MS degradada. Por el contrario, OT, OL, SC y su interacción no tuvieron un efecto significativo ($P>0,05$) sobre el CO₂ proporcional durante las 48 h de fermentación *in vitro* (Tabla 5).

7.1.5 Producción de hidrógeno fecal (H₂)

La OT, OL, SC y su interacción no tuvieron efecto ($P>0.05$) sobre la producción de H₂ fecal. Sin embargo, OT tuvo influencia ($P=0.048$) en la producción de H₂/MS degradado durante 8h, pero no tuvo efecto significativo a las 12, 4 y 48h de incubación. La inclusión de aceite de maíz disminuyó ($P<0.05$) el volumen de H₂/MS degradado a las 8h de incubación mientras que el H₂/MS incubado aumentó ($P<0.05$) durante las 48h de fermentación (Tabla 6).

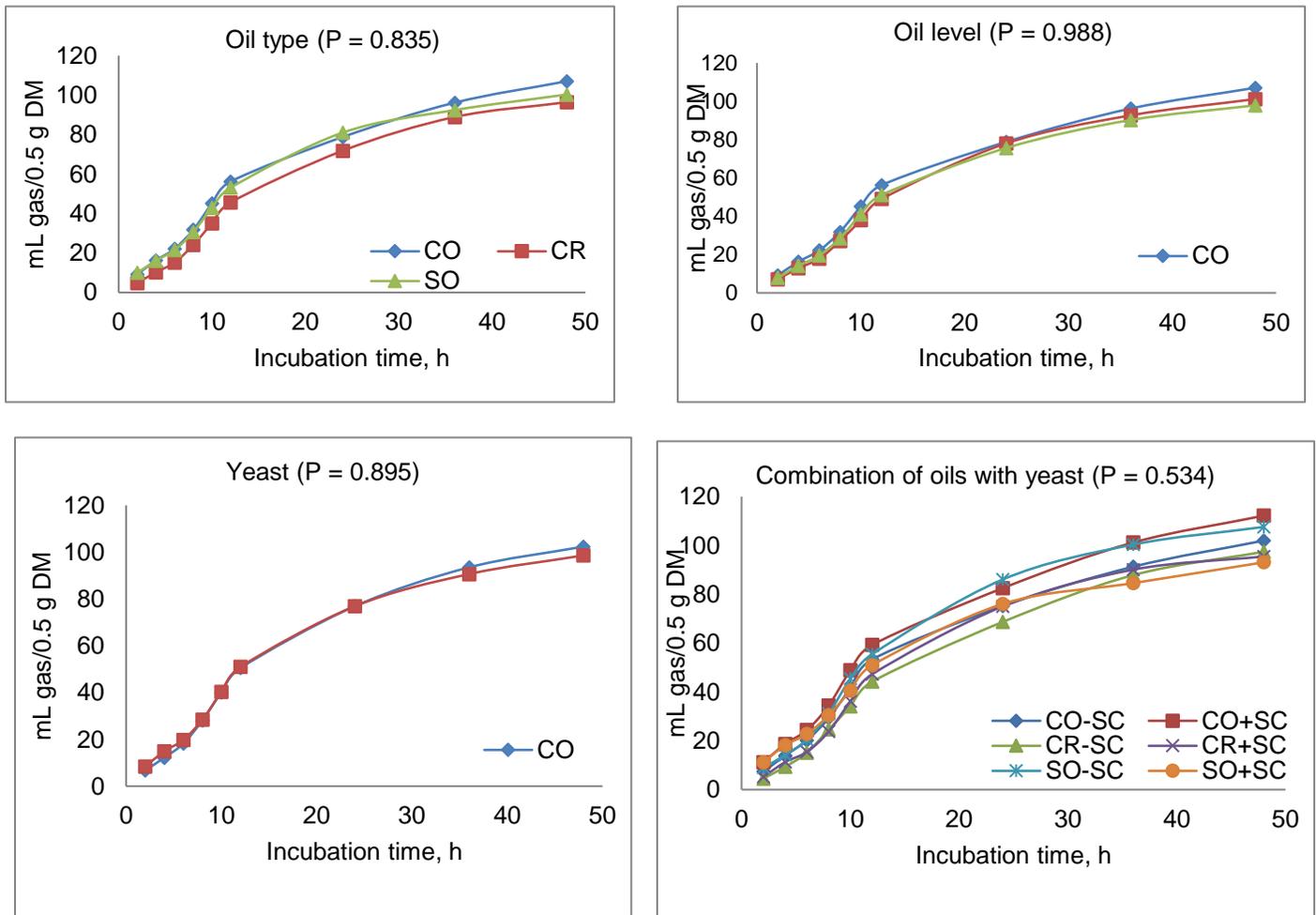


Figura 1. Producción total de gas en las heces de los caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soja (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0mg) o con (+SC, 4mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta).

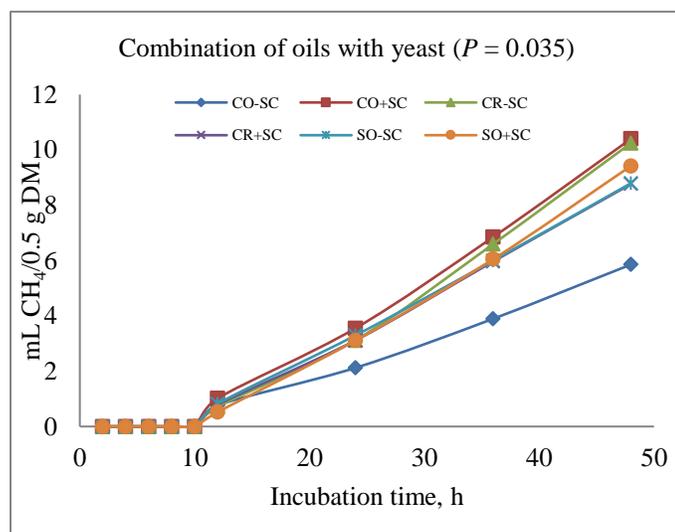
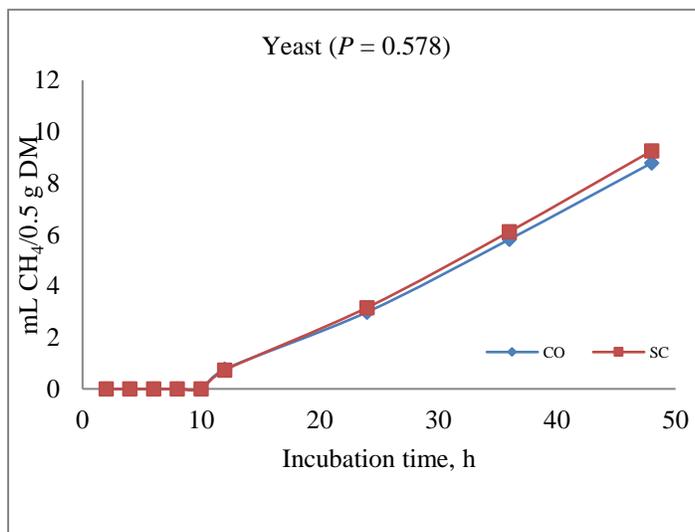
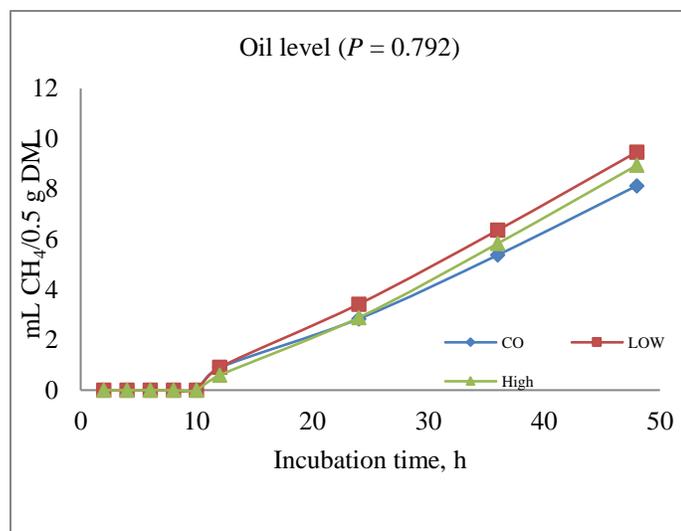
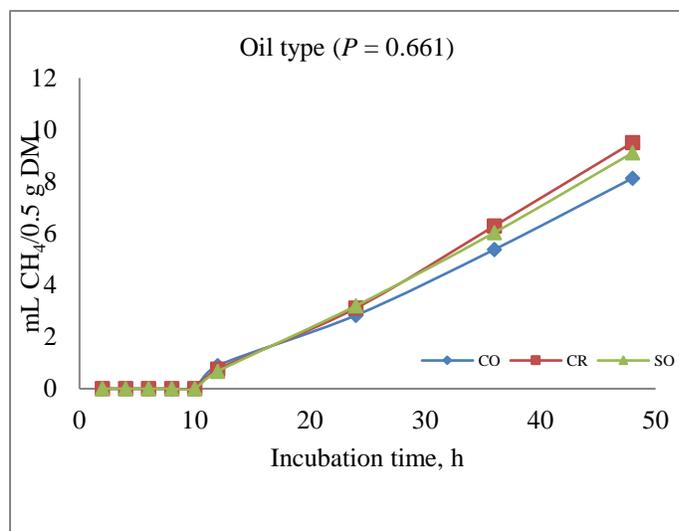


Figura 2.

Producción de metano fecal (CH_4) de los caballos ($\text{mL}/0,5\text{g}$ de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soja (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0mg) o con (+SC, 4mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta).

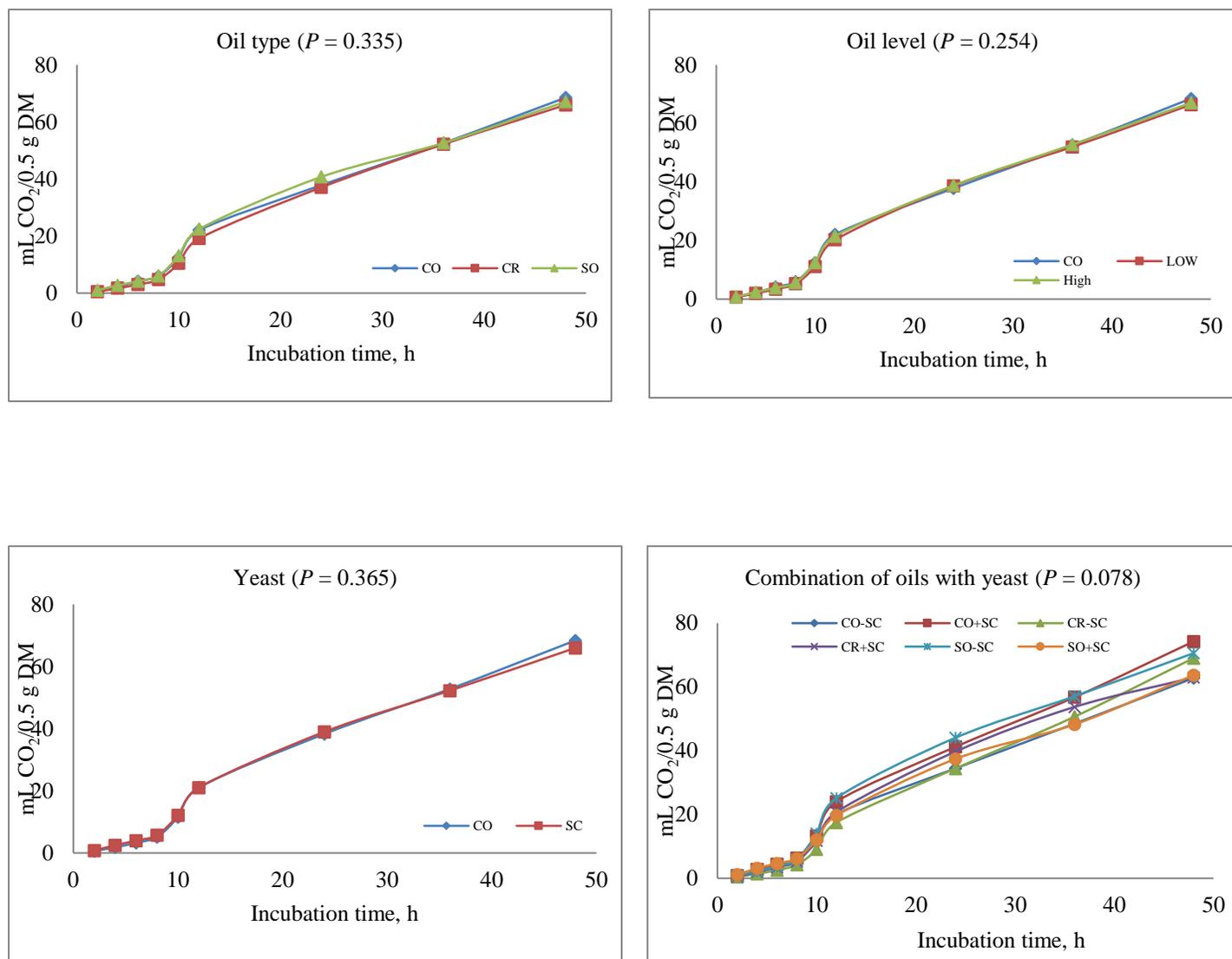


Figura 3.

Producción de dióxido de carbono (CO₂) fecal de los caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soja (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0mg) o con (+SC, 4mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta).

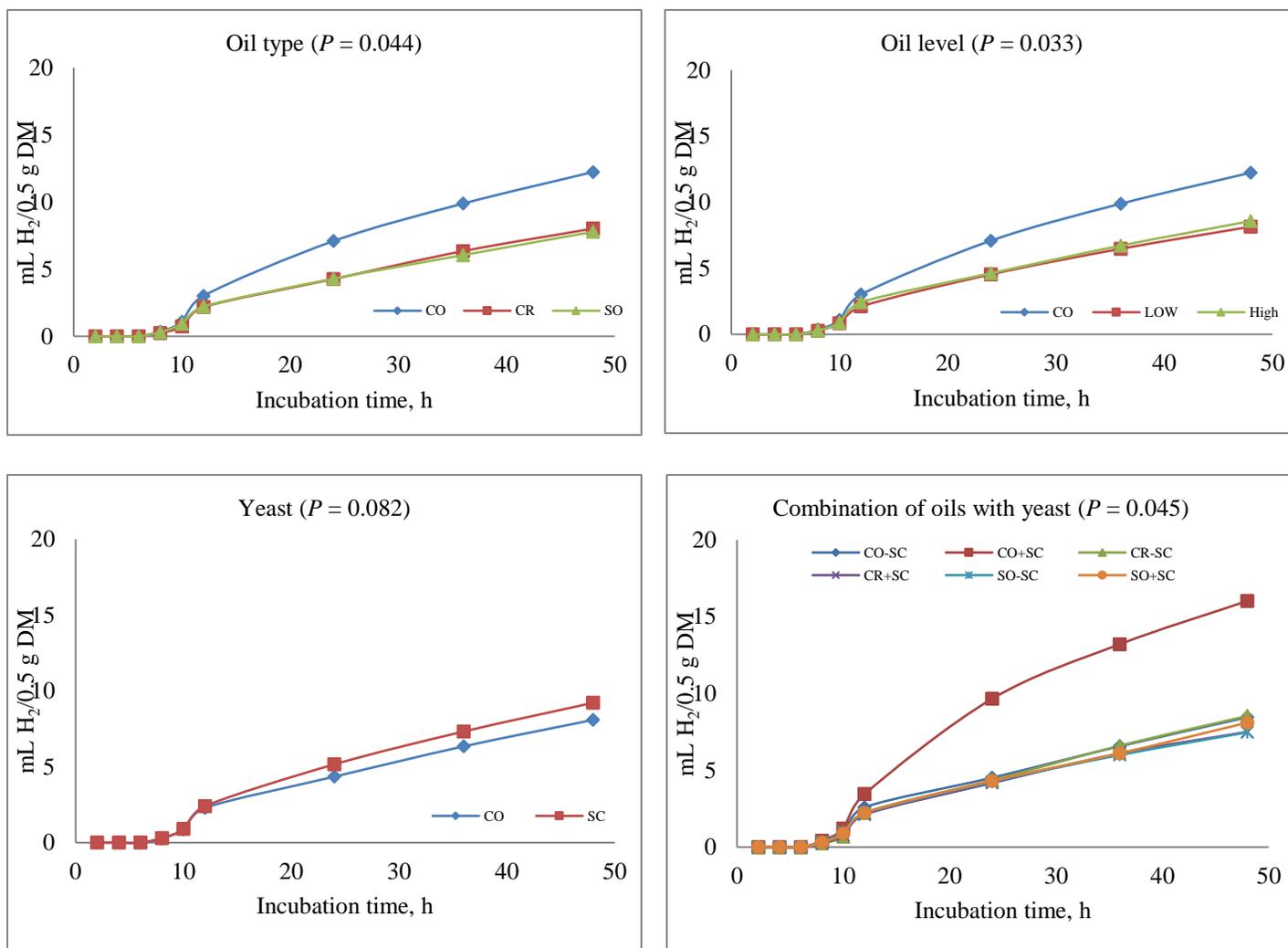


Figura 4.

Producción de hidrógeno fecal (H_2) en caballos (mL/0,5g de MS) a diferentes horas de incubación según la inclusión en la dieta de aceites de maíz (CR) y de soja (SO) a 0 (CO, control), 2,4 (bajo) y 4,8 (alto) % de la dieta total, así como su combinación sin (-SC, 0mg) o con (+SC, 4mg) de levadura viva de *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de materia seca de la dieta).

Tabla 1.
 Ingredientes de las dietas y composición química (experimento 1)

	Control	Corn oil		Soybean oil	
		Low	High	Low	High
Ingredients, %					
Oats	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Steam rolled corn	25.0	22.6	20.2	22.6	20.2
Steam rolled barley	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Wheat bran	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Corn gluten feed	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Soybean meal	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Type of oil	0.0	2.4	4.8	2.4	4.8
Molasses	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Vit/Min	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Soybean hulls	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Chemical ration composition, %					
Dry matter	86.45	86.51	86.57	86.51	86.57
Crude fiber	9.43	9.37	9.31	9.37	9.31
Crude protein	13.4	13.18	12.97	13.18	12.97
Digestible energy, Mcal/kg	3.38	3.5	3.63	3.5	3.62
Digestible crude protein, g/kg DM)	98.41	96.75	95.1	96.75	95.1
Ca	1.77	1.85	1.84	1.85	1.84
P	3.54	3.92	3.85	3.92	3.85
Mg	1.56	1.68	1.65	1.68	1.65
Na	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32
K	8.46	9.01	8.93	9.01	8.93
Cl	0.68	0.82	0.8	0.82	0.8
Zn	18.54	21.98	21.53	21.98	21.53
Cu	4.73	5.85	5.8	5.85	5.8

Fe			140.4	139.63	138.86	139.63	138.86
----	--	--	-------	--------	--------	--------	--------

Oils composition ¹	Corn Oil	Soybean oil
Energy, kcal	900	884
Total fat, g	100	100
Polyunsaturated fatty acids, g	47.7	60.71
Monounsaturated fatty acids, g	33.6	24.28
Saturated fatty acids, g	14.4	15

¹proporcionado por el fabricante Oléico® Coral Internacional, S.A. de C.V., San Luis Potosí, México.

Tabla 2: Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4mg) o sin (-, 0mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la cinética *in vitro* de los gases fecales totales, CH₄, CO₂ y H₂ de una ración mixta total suministrada a caballo

Oil type	Oil level	SC	Total gas			CH ₄			CO ₂			H ₂		
			<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>
Control	0	-	96.6	0.060	2.77	8.6	0.209	15.47	62.8	0.036	6.87	8.23	0.036	9.58
		+	107.3	0.046	2.12	11.4	0.037	17.18	76.7	0.033	7.17	15.51	0.059	10.07
Corn Oil	Low	-	88.5	0.065	3.21	10.2	0.044	14.79	66.5	0.036	7.66	6.01	0.038	9.45
		+	103.5	0.053	3.84	14.8	0.037	17.89	70.3	0.039	8.24	9.04	0.039	10.52
	High	-	99.9	0.032	2.26	12.4	0.037	17.53	87.0	0.026	14.88	10.87	0.035	12.30
		+	81.5	0.047	2.38	3.8	0.029	14.02	52.8	0.066	7.99	5.52	0.079	10.45
Soybean oil	Low	-	91.3	0.048	5.02	6.9	0.041	15.43	57.2	0.038	9.53	6.51	0.039	11.20
		+	96.0	0.057	1.14	10.6	0.023	16.78	71.6	0.049	7.34	6.22	0.036	9.37
	High	-	117.0	0.057	1.48	12.2	0.035	17.89	78.1	0.061	6.70	8.05	0.042	7.73
		+	82.5	0.058	1.06	10.2	0.036	18.48	58.3	0.052	6.26	9.64	0.038	9.54
Poold SEM ²			20.560	0.013	1.043	4.156	0.197	2.154	16.152	0.013	1.733	6.505	0.024	1.167
Additive effect ³ :														
Oil type (OT)			0.819	0.529	0.317	0.913	0.985	0.479	0.805	0.383	0.076	0.956	0.596	0.147
Oil level (OL)			0.979	0.439	0.048	0.737	0.989	0.623	0.817	0.240	0.534	0.734	0.551	0.875
SC			0.807	0.773	0.155	0.859	0.600	0.512	0.797	0.308	0.120	0.581	0.306	0.993
OT x SC			0.653	0.876	0.094	0.628	0.998	0.702	0.588	0.278	0.457	0.845	0.460	0.821
OT x OL			0.698	0.184	0.684	0.249	0.971	0.391	0.922	0.835	0.032	0.845	0.643	0.074
OL x SC			0.219	0.615	0.325	0.114	0.975	0.234	0.122	0.658	0.251	0.726	0.563	0.829

¹ *b* es la producción asintótica de gas (mL/g MS); *c* es la tasa de producción de gas (/h); *Lag* es el retraso inicial antes de que comience la producción de gas (h).

² El SEM es el error estándar de la media.

³ El valor P de la interacción entre los tres factores experimentales (tipo de aceite X nivel de aceite X SC) no fue significativo (P>0,5) para todos los parámetros medidos.

Tabla 3: Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4mg) o sin (-, 0mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre los parámetros de fermentación fecal *in vitro*, así como sobre la producción total de gases a diferentes horas de incubación de una ración mixta total suministrada a caballos.

Oil type	Oil level	SC	Fermentation parameters		Gas production ml/0.5 dry matter incubated				Gas production ml/0.5 g dry matter degraded			
			pH	DMD ¹	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	6.5	19.7	29.3	53.3	75.1	102.0	11.4	21.1	30.2	41.1
		+	6.6	21.1	34.4	59.2	82.5	112.2	14.6	25.0	34.8	46.7
Corn Oil	Low	-	6.5	44.2	27.7	48.5	73.9	94.6	10.2	17.5	27.7	35.1
		+	6.6	19.0	24.5	50.6	83.8	109.0	9.7	19.8	32.5	42.0
	High	-	6.5	19.3	21.4	39.9	63.4	100.3	8.1	14.6	22.7	36.7
		+	6.6	14.8	22.8	43.8	66.3	82.0	6.1	12.3	17.4	21.0
Soybean oil	Low	-	6.6	19.5	20.5	38.6	69.9	94.4	8.3	15.7	28.7	38.9
		+	6.7	19.3	30.9	51.3	83.7	100.9	12.4	20.4	33.5	40.4
	High	-	6.6	18.7	41.5	72.3	102.1	120.7	15.4	26.9	37.7	44.9
		+	6.7	34.8	29.9	50.5	68.3	85.3	20.3	34.4	48.0	63.2
Pool SEM ²			0.087	6.464	6.631	10.763	17.835	21.655	3.319	5.492	8.978	11.68 3
Additive effect ³ :												
Oil type (OT)			0.045	0.789	0.169	0.333	0.470	0.801	0.023	0.039	0.069	0.119
Oil level (OL)			0.989	0.435	0.529	0.568	0.825	0.865	0.319	0.350	0.892	0.780
SC			0.041	0.561	0.790	0.835	0.929	0.813	0.252	0.273	0.425	0.574
OT x SC			0.925	0.017	0.978	0.621	0.520	0.684	0.233	0.434	0.539	0.394
OT x OL			0.677	0.022	0.145	0.121	0.380	0.604	0.033	0.028	0.094	0.154
OL x SC			0.799	0.051	0.357	0.289	0.286	0.231	0.938	0.905	0.856	0.861

¹DMS es la degradabilidad de la materia seca, en %.

²El SEM es el error estándar de la media.

³El valor P de la interacción entre los tres factores experimentales (tipo de aceite X nivel de aceite X SC) no fue significativo (P>0,5) para todos los parámetros medidos.

Tabla 4: Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4mg) o sin (-, 0mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la producción *in vitro* de metano fecal (CH₄) a diferentes horas de incubación¹ de una ración mixta total alimentada a caballos.

Oil type	Oil level	SC	ml CH ₄ /0.5 dry matter incubated			ml CH ₄ /0.5 g dry matter degraded			Proportional CH ₄ production		
			12	24	48	12	24	48	12	24	48
Control	0	-	0.77	2.12	5.86	0.30	0.84	2.34	1.35	2.68	5.34
		+	1.02	3.55	10.40	0.45	1.53	4.33	1.78	4.46	9.55
Corn Oil	Low	-	1.05	3.61	9.62	0.39	1.46	3.94	2.00	4.10	8.10
		+	0.88	4.40	13.57	0.37	1.71	5.16	1.57	5.23	12.57
	High	-	0.39	2.62	10.87	0.14	0.95	4.08	1.00	4.50	11.50
		+	0.69	1.82	3.96	0.12	0.37	0.92	1.43	2.47	4.53
Soybean oil	Low	-	1.03	2.85	6.37	0.42	1.17	2.65	2.11	4.17	7.97
		+	0.68	3.40	9.66	0.26	1.34	3.79	1.27	3.60	8.27
	High	-	0.61	3.74	11.23	0.24	1.39	4.14	0.90	3.70	9.30
		+	0.37	2.82	9.19	0.20	1.74	5.99	0.73	4.07	10.73
Poold SEM ²			0.445	1.066	3.185	0.185	0.466	1.369	0.667	0.901	2.283
Additive effect ³ :											
Oil type (OT)			0.800	0.909	0.861	0.820	0.395	0.527	0.603	0.768	0.948
Oil level (OL)			0.219	0.287	0.662	0.171	0.359	0.913	0.137	0.358	0.898
SC			0.971	0.542	0.552	0.973	0.355	0.306	0.887	0.505	0.378
OT x SC			0.569	0.906	0.643	0.772	0.527	0.210	0.596	0.788	0.517
OT x OL			0.913	0.207	0.165	0.617	0.070	0.052	0.751	0.360	0.200
OL x SC			0.645	0.315	0.080	0.835	0.624	0.349	0.421	0.387	0.119

¹No se detectó producción de metano antes de las 12 h de incubación.

²Estándar de error de la media.

³El valor P de la interacción entre los tres factores experimentales (tipo de aceite X nivel de aceite X SC) no fue significativo (P>0,5) para todos los parámetros medidos.

Tabla 5. Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4mg) o sin (-, 0mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la producción *in vitro* de dióxido de carbono (CO₂) fecal a diferentes horas de incubación de una ración mixta total suministrada a caballos.

Oil type	Oil level	SC	ml CO ₂ /0.5 dry matter incubated				ml CO ₂ /0.5 g dry matter degraded				Proportional CO ₂ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	5.55	20.09	34.47	62.81	2.15	7.97	13.89	25.35	19.54	37.87	45.94	61.78
		+	6.37	24.04	41.23	74.27	2.66	9.96	17.04	30.30	19.17	40.42	49.23	65.64
Corn Oil	Low	-	4.61	20.06	40.38	68.80	1.70	7.33	15.35	25.87	17.33	41.67	53.00	71.00
		+	6.18	21.64	43.47	70.52	2.51	8.60	17.23	27.41	22.67	41.27	51.27	65.23
	High	-	3.89	14.95	28.50	69.30	1.44	5.45	10.21	25.63	17.67	36.67	44.00	71.00
		+	4.40	19.95	36.00	55.38	1.10	5.50	9.39	14.42	19.67	45.67	55.00	68.20
Soybean oil	Low	-	3.69	17.82	35.49	57.93	1.50	7.25	14.49	23.90	18.33	40.67	46.00	57.53
		+	5.72	19.57	36.40	66.35	2.25	7.68	14.41	26.55	19.67	40.67	47.57	65.90
	High	-	8.06	32.53	52.67	83.25	3.05	12.14	19.55	31.26	20.00	43.67	50.67	68.33
		+	6.61	19.86	38.47	61.07	5.01	15.22	30.37	49.49	22.33	39.73	56.07	69.73
Poold SEM ²			1.452	5.290	10.570	16.234	0.838	2.877	5.880	9.497	3.826	5.117	6.192	6.984
Additive effect ³ :														
Oil type (OT)			0.232	0.384	0.626	0.921	0.039	0.066	0.117	0.167	0.783	0.971	0.866	0.485
Oil level (OL)			0.507	0.587	0.997	0.907	0.272	0.365	0.632	0.529	0.878	0.920	0.655	0.379
SC			0.372	0.890	0.793	0.891	0.126	0.362	0.350	0.508	0.382	0.573	0.260	0.723
OT x SC			0.717	0.250	0.429	0.973	0.349	0.789	0.564	0.262	0.737	0.392	0.896	0.359
OT x OL			0.067	0.153	0.204	0.455	0.016	0.039	0.048	0.114	0.522	0.855	0.299	0.558
OL x SC			0.277	0.467	0.723	0.320	0.980	0.862	0.625	0.917	0.831	0.708	0.350	0.841

Las medias en la misma columna con diferentes superíndices difieren (P < 0,05).

¹Error estándar de la media.

³El valor P de la interacción entre los tres factores experimentales (tipo de aceite X nivel de aceite X SC) no fue significativo (P>0,5) para todos los parámetros medidos.

Tabla 6: Efecto de los aceites de maíz y de soya en combinación con (+, 4mg) o sin (-, 0mg) *Saccharomyces cerevisiae* (SC, por g de MS de la dieta) a niveles bajos (2,4%) y altos (4,8%) (% de la dieta) como aditivos alimentarios sobre la producción *in vitro* de hidrógeno fecal (H₂) a diferentes horas de incubación de una ración mixta total suministrada a caballos.

Oil type	Oil level	SC	ml H ₂ /0.5 dry matter incubated				ml H ₂ /0.5 g dry matter degraded				Proportional H ₂ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	0.29	2.59	4.52	8.45	0.11	1.00	1.78	3.35	1.00	5.17	6.25	8.42
		+	0.41	3.45	9.66	16.02	0.17	1.44	4.52	7.38	1.17	6.00	11.67	14.92
Corn Oil	Low	-	0.28	1.69	3.32	6.15	0.10	0.59	1.22	2.25	1.00	3.67	4.67	6.67
		+	0.25	2.40	4.97	9.22	0.10	0.89	1.84	3.42	1.00	5.00	6.33	9.00
	High	-	0.21	2.78	5.39	10.94	0.08	0.97	1.87	3.85	1.00	6.33	7.67	10.33
		+	0.23	1.84	3.37	5.78	0.06	0.58	0.98	1.60	1.00	4.33	5.33	7.33
Soybean oil	Low	-	0.21	1.63	3.52	6.55	0.08	0.66	1.43	2.68	1.00	3.67	4.67	6.67
		+	0.31	1.83	3.80	6.60	0.12	0.73	1.54	2.66	1.00	3.67	4.67	6.67
	High	-	0.42	2.79	5.01	8.40	0.15	1.01	1.82	3.08	1.00	4.00	5.00	7.00
		+	0.30	2.64	4.82	9.61	0.20	1.98	3.85	8.20	1.00	5.33	7.33	11.33
Poold SEM ²			0.090	0.729	4.717	6.908	0.039	0.360	2.614	3.405	0.121	1.317	5.660	6.294
Additive effect ³ :														
Oil type (OT)			0.308	0.931	0.994	0.962	0.048	0.188	0.715	0.624	1.000	0.478	0.885	0.932
Oil level (OL)			0.641	0.231	0.825	0.752	0.392	0.108	0.738	0.610	1.000	0.290	0.757	0.720
SC			0.554	0.579	0.569	0.580	0.188	0.132	0.426	0.380	0.458	0.613	0.541	0.494
OT x SC			0.982	0.895	0.972	0.865	0.304	0.269	0.747	0.583	1.000	0.594	0.852	0.798
OT x OL			0.280	0.489	0.879	0.858	0.065	0.138	0.695	0.583	1.000	1.000	0.951	0.878
OL x SC			0.496	0.341	0.757	0.720	0.952	0.841	0.955	0.878	1.000	0.594	0.918	0.959

Las medias en la misma columna con diferentes superíndices difieren (P < 0,05).

¹Error estándar de la media.

³El valor P de la interacción entre los tres factores experimentales (tipo de aceite X nivel de aceite X SC) no fue significativo (P>0,5) para todos los parámetros medidos.

7.2 Experimento 2:

Mitigación sostenible de la emisión de gases fecales de efecto invernadero de los equinos mediante el uso de aceites de cártamo y de pescado en combinación con un cultivo de levadura viva como aditivos para lograr un ecosistema más limpio

ARTICULO PUBLICADO EN LA REVISTA:

JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION, (2020): 256, 120460.

Factor de impacto: **9.297**

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120460>



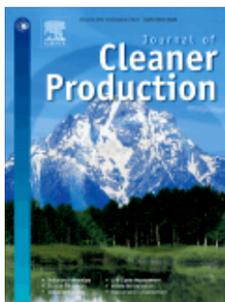
ELSEVIER

About Elsevier

Products & Solutions

Services

Home > Journals > Journal of Cleaner Production



ISSN: 0959-6526

Journal of Cleaner Production

This is a [Transformative Journal](#).

Publishing options: OA Open Access ↗ S Subscription ↗

↗ [Guide for authors](#) [Track your paper](#) ∨ [Order journal](#) ∨



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cleaner Production

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jclepro

Sustainable mitigation of fecal greenhouse gases emission from equine using safflower and fish oils in combination with live yeast culture as additives towards a cleaner ecosystem

Alejandro E. Velázquez^a, Abdelfattah Z.M. Salem^a, Ameer Khusro^b,
Alberto Barbabosa Pliego^a, Germán Buendía Rodríguez^c, Mona M.M.Y. Elghandour^{a,*}

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México

^b Research Department of Plant Biology and Biotechnology, Loyola College, Nungambakkam, Chennai, 600034, India

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. INIFAP, carretera Pachuca, Ciudad Sahagún km 3.6, Torre Norte, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2018

Received in revised form

5 February 2020

Accepted 5 February 2020

Available online 8 February 2020

Handling editor: Prof. Jiri Jaromir Klemes

Keywords:

Biogases
Dietary oils
Horse
Mitigation
Yeast

ABSTRACT

This study was investigated to determine the synergistic effect of dietary oils (safflower and fish oils) and yeast on *in vitro* biogases emission from horses fed with concentrate forage. Fecal from adult English Thoroughbred horses were used as inoculums source in this study. Oils of safflower and fish were supplemented at two different concentrations (2.4 and 4.8% v/w), while *Saccharomyces cerevisiae* was supplemented at 4 mg/g dry matter (DM) into the diet. The asymptotic gas production (GP), rate of GP, and lag period were not affected due to the supplementation of safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae*. The oil level \times *S. cerevisiae* interaction showed significant ($P = 0.047$) mitigation of asymptotic methane (CH_4) emission. In contradictory, additives revealed no influence on asymptotic, rate, and lag time of carbon dioxide (CO_2) and hydrogen (H_2) productions. The fermentation pH was unaffected, while dry matter degradability (DMD) was decreased ($P < 0.05$) due to the supplementation of additives. Further, additives increased ($P < 0.05$) *in vitro* GP up to 48 h. The safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* revealed significant ($P < 0.05$) impact on mitigating CH_4 emission. Both the oils and *S. cerevisiae* showed non-significant influence on CO_2 emission (mL/0.5 g DM incubated), while CO_2 emission (mL/0.5 g DM degraded) was reduced ($P \leq 0.05$) due to oil type \times *S. cerevisiae* and oil level \times *S. cerevisiae* interactions. Likewise, oil type \times *S. cerevisiae* interaction revealed significant ($P < 0.05$) mitigation in H_2 production (mL/0.5 g DM degraded) up to 12 h of incubation. Concisely, dietary oils and yeast can be implied as dietary manipulation strategy for mitigating *in vitro* CH_4 , CO_2 , and H_2 emission from horses. The combination of safflower oil, fish oil, and yeast could undeniably be a prominent feeding approach for livestock towards the maintenance of cleaner ecosystem.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

At present, climate change is a colossal ecological concern for mankind which is influenced either directly or indirectly by livestock through the emission of disparate detrimental greenhouse gases (GHG), particularly methane (CH_4), carbon dioxide (CO_2), and hydrogen (H_2) into the environment. As a matter of fact, livestock industries represent about 18–20% of global GHG emission, thereby elevating the ecological temperature at alarming rate. Surprisingly,

the global demand for animal's derived products is assumed to be increased in future because of exponential growth in human population (Bodirsky et al., 2015). Non-ruminants produce high quality foods and revamp their metabolism by utilizing discrete edible feed resources through anaerobic digestive mechanism. In general, the carbohydrate components of feed include plant fibres that have been degraded anaerobically by microbiota with the release of CO_2 and H_2 . Considering the predominant pathway of CH_4 emission, methanogens use CO_2 and H_2 as pivotal component (Haque, 2018).

Over the past few decades, plethora of strategies has been implemented to mitigate the emission of GHG from livestock production system. Above all, improvement in the forage digestibility by changing the fermentation pathway is considered as one of the

* Corresponding author.

E-mail address: mmohamed@uaemex.mx (M.M.M.Y. Elghandour).

highly recommended nutritional practices towards reducing the GHG emission in non-ruminants (Boadi and Wittenberg, 2002). In this regard, dietary manipulation or supplementation of feed additives is ensured as an idealistic and pragmatic approach in order to boost animal productivity as well as reduction in detrimental gases production. In fact, the supplementation of propitious additives into animal's feed leads to subsequent reduction of the substrate availability for methanogenesis by altering metabolic pathways (Haque, 2018).

In recent years, dietary oils are being used not only to enhance the energy level but also manipulate the feed fermentative process of animals. Interestingly, oils are considered persuasive nutritional feed additives for depressing the methanogenesis without influencing other adequate factors (Wanapat et al., 2013). In fact, the use of oils as an emphatic alternative to carbohydrates causes less fermentation, and thus the reduced emission of GHG is acquired. The GHG mitigation process is achieved by the decreased fermentation level of organic matters and fibres digestibility, reduced methanogenic pathway, and direct inhibition of methanogens via the hydrogenation of unsaturated fatty acids (Johnson and Johnson, 1995). On the other hand, yeasts are also known to affect the metabolic activities of microbiota, thereby affecting animal's performances. In addition, yeasts reduce the harmful GHG production from livestock by decreasing the protozoa counts, improving the butyrate or propionate yield, and promoting acetogenesis to co-metabolize H₂ with methanogens (Ingale et al., 2013). Yeasts have the unique potentiality to induce fermentation of substantial nutritional components indispensable for microbial growth and bioactivity (Polyorach et al., 2014; Patra, 2012).

Despite the utilization of distinct oils and few yeasts as prominent additives year after year, the supplementation of safflower oil (vegetable source), fish oil (animal source), and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in animal's feed for reducing the emission of detrimental biogases is scanty, probably undetermined in non-ruminants. From this point of view, the current context was investigated to determine the synergistic role of safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* in livestock industries as imperative dietary additives for mitigating the emission of CH₄, CO₂, and H₂ from horses as decisive alternative to existing conventional agents for achieving a cleaner ecosystem.

2. Materials and methods

2.1. Substrate and yeast culture

Rations were formulated in the first trial and used as substrates. Table 1 shows ingredients of diets and the composition of dietary oils used. Steam rolled corn was substituted by safflower and fish oils (Oléico® Coral Internacional, S.A. de C.V., San Luis Potosí, México) at the concentrations of 0 (control), 2.4, and 4.8% v/w. Similarly, rations were formulated as above in the second trial and implied as substrates by substituting steam rolled corn with fish oil at the concentrations of 0 (control), 2.4, and 4.8% v/w. Yeast culture i.e. Procreatin 7 (Safmex/Fermex S.A. de C.V., Toluca, Mexico) at 0 and 4 mg/g dry matter (DM) constituting 1×10^{10} cells was supplemented into each ration.

2.2. In vitro incubations and chemical analyses

Rectum of four adult English Thoroughbred horses (age – 8 to 10 years old, weight – 490 ± 21.1 kg) was used for collecting fecal as inoculum source. Experiments were carried out in Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico. Horses were fed 4 kg of concentrate diet every day (HORSE POWER Alimento

Roladopara Caballo, ALPLA Mexico) and oat hay *ad libitum*. Fecal sample was collected with rectal grab of horse. Further, feces were homogenized by mixing with Goering and Van Soest (1970) buffer solution (devoid of trypsinase). Further, cheesecloth was used for straining the mixture using O₂-free headspace. The mixture was then kept into serum bottles constituting 1 g of DM substrate.

In this experiment, 93 bottles were taken, filled, and flushed with CO₂. Bottles were closed properly, mixed, and incubated at 39 °C. Gas production and CO₂ emission were estimated up to 48 h using the Pressure Transducer Technique (Extech instruments, Waltham) as per the methods of Theodorou et al. (1994). Furthermore, CH₄, CO₂, and H₂ amount were estimated by gas detector (AIR QUALITY MONITOR YesAIR, Critical Environment Technologies Canada Inc., Delta, BC, V4G 1M3, Canada).

Bottles were uncapped after the completion of the experiments, and the measurement of pH was carried out using pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico). Content of the bottle was filtered through sintered glass crucibles (coarse porosity no. 1 pore size 100–160 µm; Pyrex, Stone, UK). The apparent dry matter degradability (DMD) was calculated after drying the residues overnight at 105 °C.

2.3. Calculations

In order to calculate GP kinetic parameters, GP results (mL/g DM) were fit as per NLIN option of SAS (2002), following France et al. (2000) equation:

$$A = b \times [1 - e^{-c(t-L)}] \quad [1]$$

where: A = volume of GP at time t; b = asymptotic GP (mL/g DM); c = rate of GP (/h), and L (h) = discrete lag time prior to GP.

The gas yield per 0.5 g DM degraded was calculated according to the following equation:

$$[\text{Gas volume (ml gas per 0.5 g DM incubated} \times \text{Weight of sample DM degraded)] / \text{Weight of sample DM incubated} \quad [2]$$

2.4. Statistical analyses

Experiments were performed in triplicate and mean values were calculated. *In vitro* GP data as well as feces fermentative results were estimated using PROC GLM option of SAS (2002) as per the below equation:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + (R \times A)_{ij} + E_{ijk} \quad [3]$$

where: Y_{ijk} = observation of the ith total mixed ration (TMR) (R_i) with jth yeast dose (A_j); μ = general mean; (R × A)_{ij} = interaction between ration type and yeast dose; E_{ijk} = experimental error. Significant level was observed at P ≤ 0.05.

3. Results

3.1. Faecal total gas, CH₄, CO₂, and H₂ kinetics

Table 2 shows the effect of safflower and fish oils (two different concentrations) in combination with *S. cerevisiae* as feed additives on *in vitro* fecal total gas, CH₄, CO₂, and H₂ kinetics of total mixed rations fed to horses. The asymptotic GP, rate of GP, and lag period were not affected due to the supplementation of safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae*. Oil type and *S. cerevisiae*, oil type and oil level, and oil level and *S. cerevisiae* interactions also exhibited no impact on asymptotic GP, rate of GP, and lag period. However, the

Table 1
Diets ingredients and composition of oils.

	Control	Safflower oil		Fish oil	
		Low	High	Low	High
Ingredients (%)					
Oats	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Steam rolled corn	25.0	22.6	20.2	22.6	20.2
Steam rolled barley	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Wheat bran	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Corn gluten feed	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Soybean meal	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Type of oil	0.0	2.4	4.8	2.4	4.8
Molasses	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Vit/Min	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Soybean hulls	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Chemical ration composition (%)					
Dry matter	86.45	86.51	86.57	86.51	86.57
Crude fiber	9.43	9.37	9.31	9.37	9.31
Crude protein	13.4	13.18	12.97	13.18	12.97
Digestible energy (Mcal/kg)	3.38	3.5	3.62	3.51	3.64
Digestible crude protein (g/kg DM)	98.41	96.75	95.1	96.75	95.1
Ca	1.77	1.85	1.84	1.85	1.84
P	3.54	3.92	3.85	3.92	3.85
Mg	1.56	1.68	1.65	1.68	1.65
Na	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32
K	8.46	9.01	8.93	9.01	8.93
Cl	0.68	0.82	0.8	0.82	0.8
Zn	18.54	21.98	21.53	21.98	21.53
Cu	4.73	5.85	5.8	5.85	5.8
Fe	140.4	139.63	138.86	139.63	138.86
Oils Composition^a		Safflower oil		Fish oil	
Energy (kcal)		884		902	
Total fat (g)		100		100	
Polyunsaturated fatty acids (g)		14.28		16	
Monounsaturated fatty Acids (g)		78.57		57	
Saturated fatty acids (g)		7.14		21	

^a Provided by the manufacture Oléico® Coral Internacional, S.A. de C.V., San Luis Potosí, México.

Table 2
Effect of safflower and fish oils in combination with *S. cerevisiae* as feed additives on *in vitro* fecal total gas, CH₄, CO₂ and H₂ kinetics^a.

Oil type	Oil level	SC	Total gas			CH ₄			CO ₂			H ₂		
			b	c	Lag	b	c	Lag	b	c	Lag	b	c	Lag
Control	0	-	96.6	0.060	2.77	8.6	0.209	15.47	62.8	0.036	6.87	8.2	0.036	9.58
		+	107.3	0.046	2.12	11.4	0.037	17.18	76.7	0.033	7.17	15.5	0.059	10.07
Safflower oil	Low	-	81.7	0.061	1.26	6.7	0.030	14.24	53.0	0.061	6.94	13.8	0.117	8.83
		+	88.6	0.046	1.35	12.2	0.033	18.30	52.2	0.028	7.13	20.0	0.039	11.29
Safflower oil	High	-	108.4	0.052	1.35	15.6	0.035	20.24	76.0	0.034	7.46	17.8	0.034	10.43
		+	103.8	0.064	3.28	10.5	0.039	17.50	61.7	0.034	10.41	9.5	0.039	9.53
Fish oil	Low	-	62.5	0.062	1.09	1.1	0.005	12.32	38.9	0.033	7.32	6.2	0.124	11.23
		+	106.3	0.033	3.81	16.6	0.028	13.76	75.7	0.037	7.68	11.3	0.042	10.36
Fish oil	High	-	95.3	0.043	2.96	5.0	0.029	15.77	57.6	0.032	5.79	16.1	0.033	9.91
		+	98.8	0.048	1.88	3.8	0.023	18.52	70.1	0.037	6.90	8.7	0.045	9.32
Pooled SEM ^b			33.03	0.0180	1.503	6.45	0.0752	2.966	20.91	0.0097	2.056	8.47	0.039	1.476
Additive effect:														
Oil type (OT)			0.729	0.316	0.333	0.173	0.925	0.115	0.989	0.328	0.300	0.360	0.877	0.800
Oil level (OL)			0.239	0.883	0.446	0.907	0.958	0.035	0.272	0.266	0.716	0.963	0.078	0.392
SC			0.275	0.205	0.355	0.186	0.667	0.218	0.205	0.193	0.253	0.730	0.316	0.770
OT × SC			0.428	0.582	0.881	0.304	0.985	0.643	0.125	0.038	0.682	0.996	0.966	0.304
OT × OL			0.770	0.714	0.418	0.238	0.989	0.626	0.638	0.312	0.140	0.500	0.950	0.450
OL × SC			0.361	0.101	0.447	0.047	0.961	0.378	0.362	0.089	0.391	0.190	0.066	0.295

0 = No additive, Low = 2.4% v/w, High = 4.8% v/w, - = 0 mg/g DM, + = 4 mg/g DM, SC = *S. cerevisiae*.

^a b is the asymptotic GP (mL/g DM); c is the rate of GP (h); Lag is the initial delay before GP begins (h).

^b SEM is standard error of mean.

^c Value of the interaction among three experimental factors was non-significant ($P > 0.05$).

Table 3
Effect of safflower and fish oils in combination with *S. cerevisiae* as feed additives on *in vitro* fecal fermentation parameters as well as total GP at different incubation period.

Oil type	Oil level	SC	Fermentation parameters		Gas production mL/0.5 g dry matter incubated				Gas production mL/0.5 g dry matter degraded			
			pH	DMD ^a	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	6.5	19.7	29.3	53.3	75.1	102.0	11.4	21.1	30.2	41.1
		+	6.6	21.1	34.4	59.2	82.5	112.2	14.6	25.0	34.8	46.7
Safflower oil	Low	-	6.4	22.2	28.8	48.6	71.7	84.4	12.6	21.5	32.6	38.5
		+	6.5	22.0	27.8	46.9	63.2	93.7	12.1	20.7	27.5	40.6
	High	-	6.6	37.8	34.1	65.0	84.6	118.3	26.5	51.1	66.5	92.9
		+	6.5	20.0	28.2	52.7	83.2	110.9	11.6	21.7	34.3	45.1
Fish oil	Low	-	6.5	20.7	20.9	37.9	55.6	65.9	9.2	16.6	25.3	29.9
		+	6.6	26.9	28.6	47.7	77.2	107.0	16.9	27.4	42.1	57.7
	High	-	6.6	22.6	30.7	48.6	79.8	100.3	14.1	22.6	37.6	47.1
		+	6.6	17.7	31.5	54.5	82.9	104.5	11.0	19.7	29.7	37.1
Pooled SEM ^b			0.14	5.60	9.50	16.75	28.36	33.49	6.47	12.21	19.16	23.52
Additive effect ^c :												
Oil type (OT)			0.229	0.121	0.660	0.376	0.873	0.606	0.257	0.131	0.364	0.217
Oil level (OL)			0.383	0.484	0.263	0.155	0.184	0.155	0.226	0.132	0.162	0.132
SC			0.537	0.143	0.568	0.699	0.593	0.306	0.621	0.438	0.507	0.635
OT × SC			0.876	0.035	0.351	0.284	0.459	0.452	0.055	0.048	0.113	0.085
OT × OL			0.876	0.024	0.668	0.866	0.948	0.740	0.165	0.090	0.160	0.092
OL × SC			0.370	0.003	0.357	0.289	0.286	0.231	0.017	0.029	0.077	0.020

0 = No additive, Low = 2.4% v/w, High = 4.8% v/w, - = 0 mg/g DM, + = 4 mg/g DM, SC = *S. cerevisiae*.

^a DMD is dry matter degradability (%).

^b SEM is standard error of mean.

^c Value of the interaction among three experimental factors was non-significant ($P > 0.05$).

supplementation of oil and *S. cerevisiae* revealed increment in the lag period from 2.77 to 3.28 h and 3.81 h for safflower oil and fish oil, respectively (Table 2). The oil level × *S. cerevisiae* showed significant ($P = 0.047$) mitigation in asymptotic CH₄ emission. The interaction between oil type and *S. cerevisiae*, and oil type and oil level exhibited non-significant impact on the rate of CH₄ emission. On the other hand, safflower oil and fish oil at 2.4 and 4.8% v/w showed significant ($P = 0.035$) influence on lag period of CH₄ production (Table 2). The oil type × *S. cerevisiae*, oil type × oil level, and oil level × *S. cerevisiae* interactions showed no effect on asymptotic and lag time of CO₂ and H₂ productions (Table 2).

3.2. *In vitro* fermentation profile and GP

The fermentation pH was unaffected due to the supplementation of safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* at distinct concentrations. Oil type and *S. cerevisiae*, oil type and oil level, and oil level and *S. cerevisiae* interactions also showed no impact on pH level. In contrary, the oil type × *S. cerevisiae*, oil type × oil level, and oil level × *S. cerevisiae* interactions showed reduction ($P < 0.05$) on DMD (Table 3).

Fig. 1 depicts *in vitro* GP (mL/0.5 g DM incubated) at different incubation periods as influenced by different feed additives.

Table 4
Effect of safflower and fish oils in combination with *S. cerevisiae* as feed additives on *in vitro* fecal CH₄ production at different incubation period.

Oil type	Oil level	SC	mL CH ₄ /0.5 g dry matter incubated				mL CH ₄ /0.5 g dry matter degraded				% of CH ₄ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	0.00	0.77	2.12	5.86	0.00	0.30	0.84	2.34	0.00	1.35	2.68	5.34
		+	0.00	1.02	3.55	10.40	0.00	0.45	1.53	4.33	0.00	1.78	4.46	9.55
Safflower oil	Low	-	0.00	1.23	3.05	5.57	0.00	0.61	1.49	2.65	0.00	2.47	3.67	6.07
		+	0.00	1.08	3.41	10.90	0.00	0.53	1.59	4.99	0.00	2.10	5.23	11.50
	High	-	0.00	0.33	3.57	13.63	0.00	0.27	2.50	9.43	0.00	0.50	4.43	12.30
		+	0.00	0.93	3.25	9.26	0.00	0.42	1.34	3.63	0.00	1.53	4.07	9.13
Fish oil	Low	-	0.00	0.33	0.72	1.29	0.00	0.16	0.34	0.60	0.00	0.83	1.27	2.13
		+	0.00	0.61	1.51	3.38	0.00	0.34	0.85	1.91	0.00	1.07	1.73	3.07
	High	-	0.00	0.84	2.40	4.97	0.00	0.42	1.18	2.39	0.00	1.80	2.76	4.76
		+	0.00	0.32	1.13	3.51	0.00	0.11	0.43	1.28	0.00	0.57	1.37	3.38
Pooled SEM ^a			0.000	0.803	1.708	3.873	0.000	0.412	0.884	1.865	0.000	1.342	1.812	3.536
Additive effect ^b :														
Oil type (OT)			0.00	0.312	0.015	0.002	0.00	0.249	0.007	0.0001	0.00	0.341	0.003	0.001
Oil level (OL)			0.00	0.569	0.577	0.203	0.00	0.546	0.421	0.070	0.00	0.398	0.818	0.331
SC			0.00	0.698	0.546	0.291	0.00	0.793	0.922	0.987	0.00	0.885	0.351	0.246
OT × SC			0.00	0.630	0.858	0.967	0.00	0.796	0.582	0.306	0.00	0.495	0.507	0.697
OT × OL			0.00	0.383	0.750	0.743	0.00	0.485	0.812	0.235	0.00	0.223	0.632	0.893
OL × SC			0.00	0.978	0.358	0.101	0.00	0.703	0.092	0.005	0.00	0.978	0.239	0.123

0 = No additive, Low = 2.4% v/w, High = 4.8% v/w, - = 0 mg/g DM, + = 4 mg/g DM, SC = *S. cerevisiae*.

^a SEM standard error of mean.

^b Value of the interaction among three experimental factors was non-significant ($P > 0.05$).

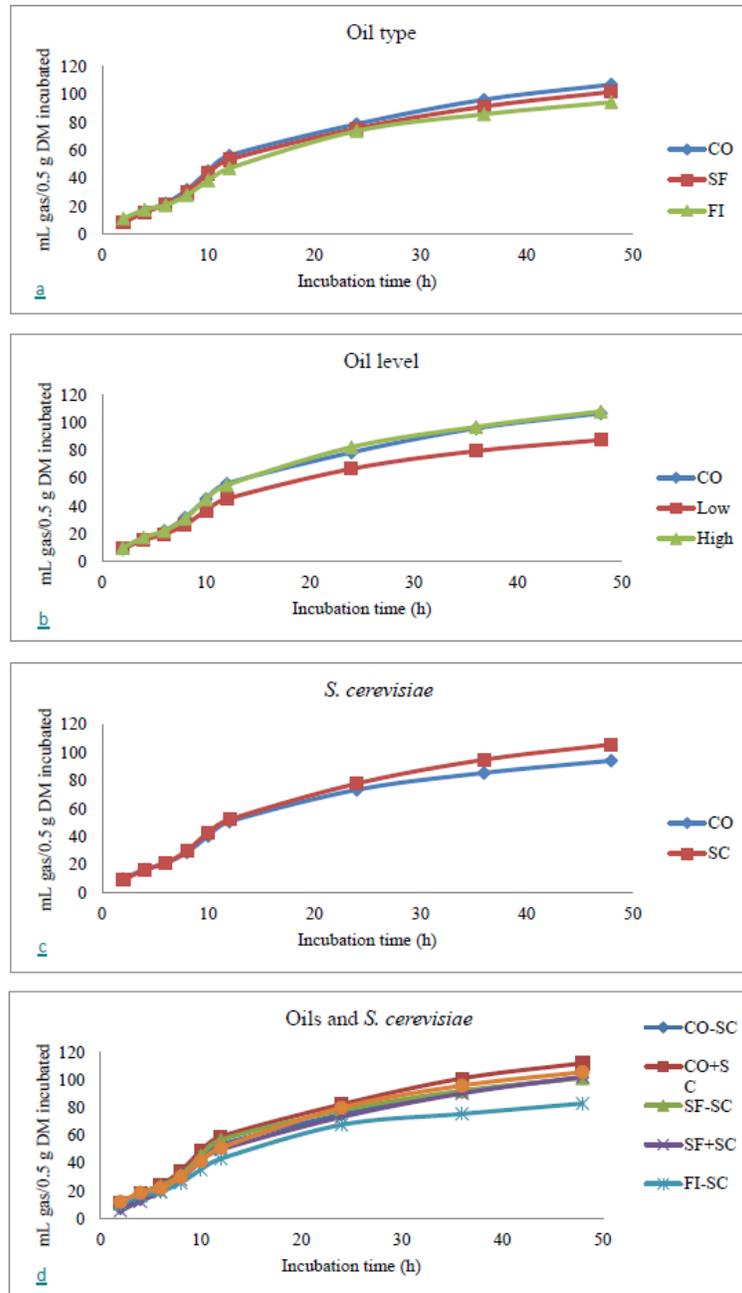


Fig. 1. Horse fecal total GP (mL/0.5 g DM) at different incubation period as affected by the dietary inclusion of (a) Safflower (SF) and Fish (FI) oils with respect to control (CO), (b) lower and higher doses of oils, (c) *S. cerevisiae* (SC), and (d) combination of oils and SC. Low dose = 2.4% v/w, high dose = 4.8% v/w, -SC = 0 mg/g DM, and +SC = 4 mg/g DM.

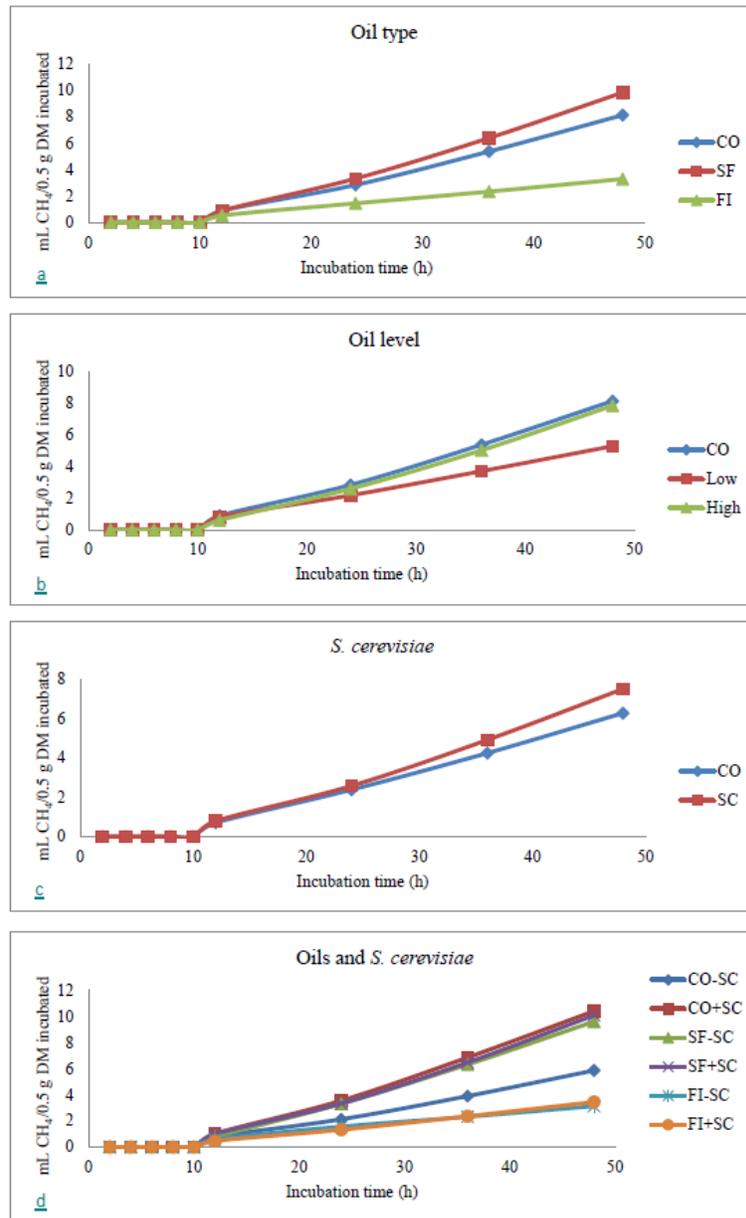


Fig. 2. Horse fecal CH_4 production (mL/0.5 g DM) at different incubation period as affected by the dietary inclusion of (a) Safflower (SF) and Fish (FI) oils with respect to control (CO), (b) lower and higher doses of oils, (c) *S. cerevisiae* (SC), and (d) combination of oils and SC. Low dose = 2.4% v/w, high dose = 4.8% v/w, -SC = 0 mg/g DM, and +SC = 4 mg/g DM.

In vitro GP (mL/0.5 g DM incubated) was estimated to be increased due to the supplementation of oils and yeast. The oil type \times *S. cerevisiae*, oil type \times oil level, and oil level \times *S. cerevisiae* interactions also showed non-significant increment towards *in vitro* GP (mL/0.5 g DM incubated) with

increase ($P < 0.05$) in incubation period from 8 to 48 h. On the other hand, oil level \times *S. cerevisiae* interaction revealed significant ($P < 0.05$) impact on *in vitro* GP (mL/0.5 g DM degraded) up to 48 h of incubation period (Table 3).

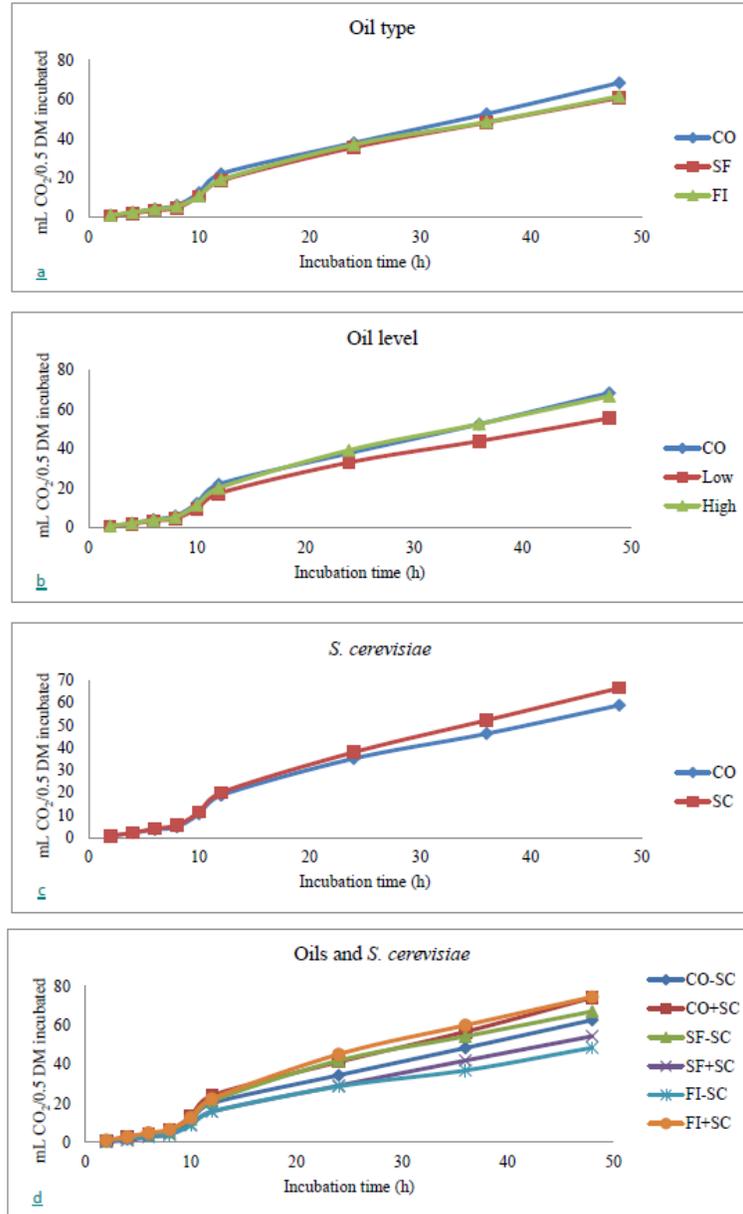


Fig. 3. Horse fecal CO₂ production (mL/0.5 g DM) at different incubation period as affected by the dietary inclusion of (a) Safflower (SF) and Fish (FI) oils with respect to control (CO), (b) lower and higher doses of oils, (c) *S. cerevisiae* (SC), and (d) combination of oils and SC. Low dose = 2.4% v/w, high dose = 4.8% v/w, -SC = 0 mg/g DM, and +SC = 4 mg/g DM.

3.3. Effect of additives on CH₄ emission

Fig. 2 exhibits *in vitro* CH₄ emission (mL/0.5 g DM incubated) with increase in incubation period due to dietary inclusion of additives. There was complete lack of CH₄ production up to 10 h of

incubation period. However, the safflower oil and fish oil had effect ($P < 0.05$) on mitigating CH₄ emission with respect to control diet. Similarly, *in vitro* CH₄ emission (mL/0.5 g DM degraded) was reduced ($P = 0.005$) due to oil level × *S. cerevisiae* interaction. The proportional CH₄ emission was influenced ($P < 0.05$) at 24 and 48 h

because of the supplementation of safflower and fish oils. The interactions between rations \times doses showed non-significant impact towards proportional CH₄ emission (Table 4).

3.4. Effect of additives on CO₂ emission

In vitro CO₂ emission (mL/0.5 g DM incubated) with increase in incubation period due to dietary inclusion of additives is shown in Fig. 3. Both the ration type and *S. cerevisiae* had no effect on CO₂ emission (mL/0.5 g DM incubated) with respect to control. In contrary, CO₂ emission (mL/0.5 g DM degraded) was reduced ($P \leq 0.05$) due to oil type \times *S. cerevisiae* and oil level \times *S. cerevisiae* interactions. In like manner, proportional CO₂ emission was influenced ($P < 0.05$) up to 48 h due to oil type \times *S. cerevisiae* interaction (Table 5).

3.5. Effect of additives on H₂ emission

Fig. 4 exhibits *in vitro* H₂ emission (mL/0.5 g DM incubated) with increase ($P < 0.05$) in incubation period due to dietary inclusion of additives. *In vitro* H₂ production (mL/0.5 g DM incubated) was slightly increased at treatment levels with respect to control. On the other hand, oil type \times *S. cerevisiae* interaction revealed significant ($P < 0.05$) mitigation in H₂ production (mL/0.5 g DM degraded) only at 8 and 12 h of incubation. Proportional H₂ emission was not influenced due to oils and *S. cerevisiae* at all incubation periods (Table 6).

4. Discussion

Enhancing the efficiency and productivity of livestock through influential dietary manipulation are considered as substantial approach towards the mitigation of GHG from animals. In fact, a high fraction of energy in animals is directed towards the yield of invaluable products due to improved production efficiency, thereby reducing the detrimental gases emission per unit product (Kataria, 2015). The quality of forage is known to affect the GHG yield in livestock. In general, high quality forage consists of fermentable saccharides and reduced level of neutral detergent fibre, which

leads to high digestibility as well as passage rate, thereby mitigating the production of CH₄, CO₂, and H₂ emission by changing the fermentative pathways (Beever et al., 1986). Variations in chemical composition of various feed are also responsible for reducing the production of GHG in animals. Currently, in developing countries, livestock are fed with diets that are low in digestibility and nutritional composition. Undoubtedly, it represents global implications and leads to increased emission of GHG. Considering the above mentioned facts, in the present study, safflower and fish oil with high digestible energy, digestible crude protein, and energy level were used as dietary additives in feed not only to improve efficiency but also reducing the production of GHG in horses. On the other hand, yeasts are known to enhance total count of hindgut microbiota, which results into the improved digestibility of forage (Morgan, 2006). In view of this, we further attempted to evaluate the feed fermentation capability of oils along with varied doses of *S. cerevisiae*.

The asymptotic GP, rate of GP, and lag period were not affected by supplementing safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae*. Oil type and *S. cerevisiae*, oil type and oil level, and oil level and *S. cerevisiae* interactions also exhibited non-significant impact on asymptotic GP, rate of GP, and lag period. The microbial growth and release of digestive enzymes affect the fermentative potency of diverse constituents of feed (Getachew et al., 2004). Ferraro et al. (2016) showed increased GP rate due to glycerol, propylene glycol, and molasses supplementation. The increased lag time for GP by supplementing oils and *S. cerevisiae* suggests the delayed adaptive strategies of microbiota towards diets. Our results agree with Ferraro et al. (2016) who demonstrated that energy supplements in livestock diet stimulated the microbial adaptation and reduced the lag period.

The oil level \times *S. cerevisiae* interaction showed significant reduction in asymptotic CH₄ production. Oil type and *S. cerevisiae*, and oil type and oil level interactions exhibited non-significant impact on CH₄ emission rate. On the other hand, safflower oil and fish oil at 2.4 and 4.8% v/w showed significant influence on lag period of CH₄ production. Observation more or less similar to our results was reported by Elghandour et al. (2016a) who revealed lack of ration impact on CH₄ emission rate and lag period of emission.

Table 5
Effect of safflower and fish oils in combination with *S. cerevisiae* as feed additives on *in vitro* fecal CO₂ production at different incubation period.

Oil type	Oil level	SC	mL CO ₂ /0.5 g dry matter incubated				mL CO ₂ /0.5 g dry matter degraded				% of CO ₂ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	5.55	20.09	34.47	62.81	2.15	7.97	13.89	25.35	19.54	37.87	45.94	61.78
Safflower oil	Low	+	6.37	24.04	41.23	74.27	2.66	9.96	17.04	30.30	19.17	40.42	49.23	65.64
		-	4.84	19.06	40.28	57.54	2.14	8.50	18.76	26.66	18.67	40.33	54.67	67.00
	High	+	4.85	16.02	25.00	50.27	2.20	7.24	10.95	21.85	17.67	34.33	39.77	53.77
		-	5.48	23.45	43.64	76.91	3.96	18.58	33.22	58.84	16.67	36.00	52.33	66.00
Fish oil	Low	+	3.34	15.58	33.25	58.70	1.40	6.51	13.90	23.99	11.33	28.87	37.53	51.90
		-	2.41	12.07	21.15	38.09	1.10	5.33	9.49	17.33	11.33	30.67	39.73	57.73
	High	+	6.66	22.56	46.08	76.82	3.84	12.65	25.36	42.11	24.67	48.33	60.67	72.20
		-	5.98	19.44	36.29	59.07	2.74	8.99	17.00	27.69	17.70	36.37	42.70	56.03
		+	6.71	22.12	44.35	72.58	2.19	7.46	15.27	25.51	22.33	43.00	55.00	70.67
Pooled SEM ^a			2.263	7.257	14.897	21.778	1.205	4.922	9.607	15.250	6.423	7.545	8.983	7.887
Additive effect ^b :														
Oil type (OT)			0.404	0.870	0.831	0.939	0.929	0.413	0.511	0.425	0.295	0.163	0.400	0.325
Oil level (OL)			0.482	0.399	0.352	0.283	0.610	0.317	0.318	0.234	0.699	0.480	0.656	0.737
SC			0.321	0.526	0.522	0.308	0.808	0.615	0.629	0.728	0.363	0.289	0.611	0.677
OT \times SC			0.074	0.067	0.063	0.065	0.022	0.018	0.008	0.011	0.034	0.007	0.000	0.003
OT \times OL			0.252	0.816	0.946	0.788	0.609	0.167	0.180	0.088	0.269	0.447	0.909	0.984
OL \times SC			0.151	0.328	0.655	0.382	0.005	0.015	0.05	0.019	0.245	0.364	0.601	0.969

0 = No additive, Low = 2.4% v/w, High = 4.8% v/w, - = 0 mg/g DM, + = 4 mg/g DM, SC = *S. cerevisiae*.

^a SEM standard error of mean.

^b Value of the interaction among three experimental factors was non-significant ($P > 0.05$).

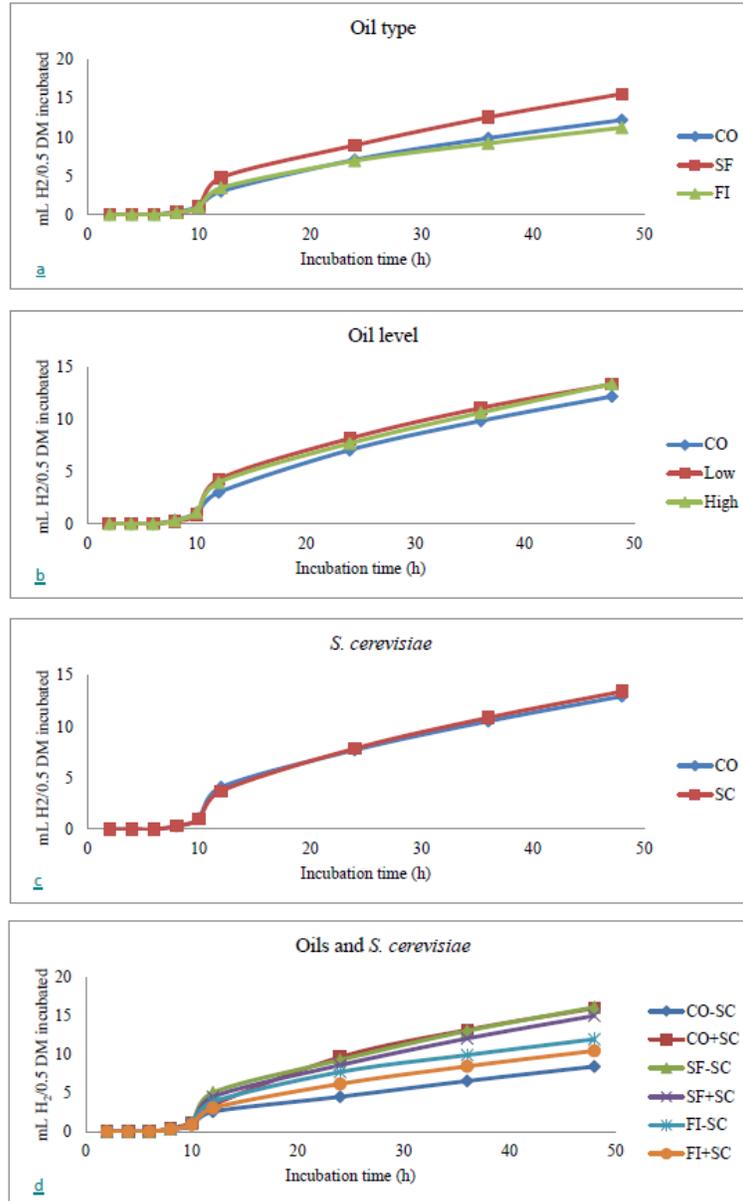


Fig. 4. Horse fecal H₂ production (mL/0.5 g DM) at different incubation period as affected by the dietary inclusion of (a) Safflower (SF) and Fish (FI) oils with respect to control (CO), (b) lower and higher doses of oils, (c) *S. cerevisiae* (SC), and (d) combination of oils and SC. Low dose = 2.4% v/w, high dose = 4.8% v/w, -SC = 0 mg/g DM, and +SC = 4 mg/g DM.

Further, authors revealed lack of effect of ration type × dose interaction on CO₂ production. In this study, the oil type × *S. cerevisiae*, oil type × oil level, and oil level × *S. cerevisiae* interactions showed lack of effect on not only the asymptotic, rate, and lag time of CO₂ but also H₂ emission. Currently, no reports are available investigating the synergistic role of safflower oil, fish oil,

and *S. cerevisiae* on CO₂ and H₂ kinetics in livestock; therefore, the comparison between our findings and previous reports could not be discussed.

The supplementation of safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* at distinct concentrations showed no significant impact on pH level and DMD. Elghandour et al. (2016a) and Lattimer et al. (2007) who

Table 6
Effect of safflower and fish oils in combination with *S. cerevisiae* as feed additives on *in vitro* fecal H₂ production at different incubation period.

Oil type	Oil level	SC	mL H ₂ /0.5 dry matter incubated				mL H ₂ /0.5 g dry matter degraded				% of H ₂ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	0.29	2.59	4.52	8.45	0.11	1.00	1.78	3.35	1.00	5.17	6.25	8.42
Safflower oil	Low	+	0.41	3.45	9.66	16.02	0.17	1.44	4.52	7.38	1.17	6.00	11.67	14.92
		-	0.29	5.09	10.03	14.61	0.13	2.43	4.87	7.09	1.00	10.33	12.00	14.67
	High	+	0.28	6.07	11.57	20.31	0.12	2.86	5.46	9.40	1.00	12.00	18.00	22.00
		-	0.34	5.03	8.58	17.71	0.26	3.58	6.00	12.16	1.00	8.00	10.67	16.00
Fish oil	Low	+	0.28	2.96	5.68	9.79	0.12	1.21	2.32	3.95	1.00	5.67	6.67	8.67
		-	0.21	2.61	4.49	7.01	0.09	1.07	1.95	3.05	1.00	6.67	8.33	11.00
	High	+	0.29	3.29	6.69	11.73	0.17	2.03	3.94	6.74	1.00	7.00	9.33	11.33
		-	0.31	5.13	10.96	16.99	0.14	2.46	5.31	8.17	1.00	10.00	12.00	15.00
Pooled SEM ^a			0.32	2.81	5.68	9.25	0.11	0.96	1.99	3.23	1.00	5.33	7.00	9.00
			0.107	2.343	5.931	8.894	0.068	1.274	3.286	4.872	0.039	4.065	6.852	7.934
Additive effect ^b :														
Oil type (OT)			0.765	0.147	0.592	0.422	0.322	0.072	0.506	0.341	1.000	0.277	0.550	0.479
Oil level (OL)			0.441	0.752	0.900	0.997	0.290	0.921	0.942	0.917	1.000	0.277	0.526	0.625
SC			0.414	0.739	0.798	0.753	0.916	0.409	0.987	0.973	0.458	0.603	0.716	0.821
OT × SC			0.522	0.879	0.908	0.971	0.091	0.476	0.830	0.696	1.000	0.567	0.737	0.789
OT × OL			0.769	0.153	0.393	0.492	0.222	0.674	0.678	0.868	1.000	0.112	0.434	0.519
OL × SC			0.626	0.099	0.427	0.232	0.035	0.009	0.247	0.113	1.000	0.164	0.372	0.323

0 = No additive, Low = 2.4% v/w, High = 4.8% v/w, - = 0 mg/g DM, + = 4 mg/g DM, SC = *S. cerevisiae*.

^a SEM standard error of the mean.

^b Value of the interaction among three experimental factors was non-significant ($P > 0.05$).

obtained no alteration in the pH and DMD by supplementing yeast in high concentrate diet depicted similar observations. In contrary to this, Hernandez et al. (2017) demonstrated significant reduction in pH and *in vitro* DMD by supplementing garlic oil into the diet. The variation observed in this context might be due to the high buffering trait of fermentative mechanism and different mode of action of oils as well as *S. cerevisiae* on the microbiota (Elghandour et al., 2016b).

The effectual feed degradation is measured by estimating *in vitro* GP. Generally, the high gas values are indication of better nutritional availability to microbiota (Elghandour et al., 2017, 2018; Pedraza-Hernández et al., 2019). In this investigation, *in vitro* GP (mL/0.5 g DM incubated) was estimated to be increased due to the supplementation of oils and yeast. The oil type × *S. cerevisiae*, oil type × oil level, and oil level × *S. cerevisiae* interactions also showed increment in *in vitro* GP with increase in incubation period. Findings of the present study coincide with the report of Hernandez et al. (2017) who demonstrated significant enhancement in *in vitro* GP because of the addition of *S. cerevisiae* into high concentrate diet of dairy calves.

Oil supplements are implemented into the diet not only to achieve the high-energy requirements but also reducing CH₄ production in animals (Martin et al., 2010). In previous report, Hollmann et al. (2012) demonstrated the unique potency of lauric and myristic acids in mitigating CH₄ emission in dairy cows. Likewise, the supplementation of plant oils enriched with mono-unsaturated fatty acids or polyunsaturated fatty acids depicted significant reduction in CH₄ production in growing cattle (Beauchemin and McGinn, 2006) and lactating cows (Martin et al., 2010). In the present context, we undertook further attempt to evaluate the potentiality of safflower and fish oil to reduce the production of CH₄ in horse. Findings exhibited the significant synergistic effect of safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* in mitigating CH₄ emission with respect to control diet in horse. There was complete lack of CH₄ production up to 10 h of incubation period. Elghandour et al. (2016c) reported similar observation too who estimated negligible CH₄ emission in the beginning of incubation period due to additive supplementation. In another study, the supplementation of sunflower oil into the diet of cattle exhibited 22% reduction in CH₄ production (McGinn et al., 2004). The

variation in the mitigation rate of CH₄ emission might be due to the reduced digestibility of organic matter (OM), high propionic acid formation, type and composition of oils, and growth inhibition of microbiota (Martin et al., 2010).

In the present study, ration type and *S. cerevisiae* revealed no significant impact on CO₂ emission (mL/0.5 g DM incubated) with respect to control. In contrary, CO₂ emission (mL/0.5 g DM degraded) was mitigated due to oil type × *S. cerevisiae* and oil level × *S. cerevisiae* interactions. Our reports agree partially with the findings of Hernandez et al. (2017) who observed higher CO₂ in control diet than that of oil treatments. The tendency towards reduction of CO₂ emission at varied incubation period might be due to the stimulation of survival ability of propionate producing microbes. In fact, yeasts shift H₂ utilization from methanogenesis to reduce acetogenesis by homoacetogenic microbes that releases acetate from CO₂ and H₂ (Mwenya et al., 2004), thus decreasing CO₂ production. In contrary, Elghandour et al. (2016b) demonstrated that yeast at different doses had no significant influence on CO₂ emission. Further, in our investigation, oil type × *S. cerevisiae* interaction exhibited significant reduction in H₂ production (mL/0.5 g DM degraded) up to 12 h of incubation. Considering the lack of studies investigating the pivotal synergistic role of oils and yeast in mitigating H₂ production from horse, results obtained in this context could not be compared in the limelight of previous reports.

5. Conclusions

In summary, safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* exhibited no significant effect on asymptotic GP, rate of GP, and lag period. The asymptotic CH₄ production was reduced due to oil level × *S. cerevisiae* interaction. Additives showed no influence on asymptotic, rate, and lag time of CO₂ and H₂ emissions. Further, the safflower oil, fish oil, and *S. cerevisiae* revealed significant impact on mitigating CH₄, CO₂, and H₂ emission. Concisely, dietary oils (2.4 and 4.8% v/w) and yeast (4 mg/g DM) can be implied for mitigating *in vitro* CH₄, CO₂, and H₂ emission from horses. Further *in vivo* studies are certainly required to depict paramount efficiency of these supplements for maintaining huge concern of greenhouse gases emission from livestock.

Declaration of competing interest

There was no conflict of interest.

Acknowledgment

Authors would like to thank the financial support of the project number 4774/2019CIB from the Universidad Autónoma del Estado de México.

References

- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84, 1489–1496.
- Beever, D.E., Dhanoa, M.S., Losada, H.R., Evans, R.T., Cammell, S.B., France, J., 1986. The effect of forage species and stage of harvest on the processes of digestion occurring in the rumen of cattle. *Br. J. Nutr.* 56, 439–454.
- Boadi, D.A., Wittenberg, K.M., 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the Sulphur hexafluoride (sf6) tracer gas technique. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 201–206.
- Bodirsky, B.L., Rolinski, S., Biewald, A., Weindl, L., Popp, A., Lotze-Campen, H., 2015. Global food demand scenarios for the 21st century. *PLoS One* 10, e0139201.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Montes de Oca, R., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., et al., 2016a. 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., Kholif, A.E., López, S., Mendoza, G.D., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2016b. *In vitro* gas, methane, and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. *J. Equine Vet. Sci.* 38, 64–71.
- Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Cipriano, M.M., Camacho, L.M., 2016c. *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* 45, 389–395.
- Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Khusro, A., Cipriano-Salazar, M., Olivares-Pérez, J., Barros-Rodríguez, M.A., et al., 2017. Assessment of some browse tree leaves on gas production and sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions in dairy calves at different age. *J. Clean. Prod.* 162, 1192–1199.
- Elghandour, M.M.Y., Khusro, A., Greiner, R., Salem, A.Z.M., de la Fuente, J.L., Márquez-Molina, O., et al., 2018. Horse fecal methane and carbon dioxide productions and fermentation kinetics influenced by *Lactobacillus farciminis* supplemented diet. *J. Equine Vet. Sci.* 62, 98–101.
- Ferraro, S.M., Mendoza, G.D., Miranda, L.A., Gutiérrez, C.G., 2016. *In vitro* ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses combined with forages and their effect on glucose and insulin blood plasma concentrations after an oral drench in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 213, 74–80.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., López, S., Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* 83, 143–150.
- Getachew, G., DePeters, E.J., Robinson, P.H., 2004. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *Calif. Agric.* 58, 1–12.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. *Forage Fibre Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications)*. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC, USA.
- Haque, M.N., 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *J. Anim. Sci. Technol.* 60, 15.
- Hernandez, A., Kholif, A.E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Rodríguez, G.B., et al., 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J. Clean. Prod.* 142, 2384–2392.
- Hollmann, M., Powers, W.J., Fogiel, A.C., Liesman, J.S., Bello, N.M., Beede, D.K., 2012. Enteric methane emissions and lactational performance of Holstein cows fed different concentrations of coconut oil. *J. Dairy Sci.* 95, 2602–2615.
- Ingale, S.L., Lokhande, A., Zadbuke, S., 2013. Nutritional strategies to mitigate greenhouse gases emission from livestock agriculture: a review. *Int. J. Livest. Res.* 1, 34–45.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483–2492.
- Kataria, R.P., 2015. Use of feed additives for reducing greenhouse gas emissions from dairy farms. *Microbiol. Res.* 6, 6120.
- Lattimer, J.M., Cooper, S.R., Freeman, D.W., Lalman, D.L., 2007. Effect of yeast culture on *in vitro* fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. *J. Anim. Sci.* 85, 2484–2491.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351–365.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82, 3346–3356.
- Morgan, L.M., 2006. Effect of Yeast Culture Supplementation on Digestibility of Varying Quality Forage in Mature Horses. M.Sc. Thesis. University of Georgia, Atlanta, GA.
- Mwenya, B., Santoso, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Arai, I., et al., 2004. Effects of including 1,4-galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 313–326.
- Patra, A.K., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 366–375.
- Pedraza-Hernández, J., Elghandour, M.M.Y., Khusro, A., Camacho-Díaz, L.M., Vallejo, L.H., Barbabosa-Piiego, A., et al., 2019. Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleifera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment. *J. Clean. Prod.* 234, 779–786.
- Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using *in vitro* gas production technique. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36–45.
- SAS, 2002. *User's Guide: Statistics*. SAS Institute, Cary, NC, version 9.0.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197.
- Wanapat, M., Kang, S., Polyorach, S., 2013. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 32.

7.2.1 Cinética del gas total fecal, CH₄, CO₂ y H₂

La PG asintótica, la tasa de PG y el período de retraso no se vieron afectados por la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae*. Las interacciones entre el tipo de aceite y *S. cerevisiae*, el tipo de aceite y el nivel de aceite, y el nivel de aceite y *S. cerevisiae* tampoco afectaron a la PG asintótica, la tasa de PG y el periodo de retardo. Sin embargo, la suplementación de aceite y *S. cerevisiae* reveló un incremento en el periodo de retardo de 2,77 a 3,28h y 3,81h para el aceite de cártamo y el aceite de pescado, respectivamente. El nivel de aceite \times *S. cerevisiae* mostró una mitigación significativa ($P=0,047$) en la emisión asintótica de CH₄. La interacción entre el tipo de aceite y *S. cerevisiae*, y el tipo de aceite y el nivel de aceite mostraron un impacto no significativo en la tasa de emisión de CH₄. Por otro lado, el aceite de cártamo y el aceite de pescado al 2,4 y 4,8% v/p mostraron una influencia significativa ($P=0,035$) en el periodo de retardo de la producción de CH₄. Las interacciones tipo de aceite \times *S. cerevisiae*, tipo de aceite \times nivel de aceite y nivel de aceite \times *S. cerevisiae* no mostraron ningún efecto sobre el tiempo asintótico y de retraso de las producciones de CO₂ y H₂ (Tabla 8).

Perfil de fermentación *in vitro* y PG

El pH de la fermentación no se vio afectado por la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae* a distintas concentraciones. Las interacciones entre el tipo de aceite y *S. cerevisiae*, el tipo de aceite y el nivel de aceite, y el nivel de aceite y *S. cerevisiae* tampoco mostraron ningún impacto en el nivel de pH. Por el contrario, las interacciones tipo de aceite \times *S. cerevisiae*, tipo de aceite \times nivel de aceite y nivel de aceite \times *S. cerevisiae* mostraron una reducción ($P<0,05$) en la DMS (Tabla 9).

La Figura 5 muestra la PG *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) en diferentes períodos de incubación según la influencia de diferentes aditivos para piensos. Se estimó que la PG *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) aumentó debido a la suplementación de aceites y levaduras. Las interacciones tipo de aceite \times *S. cerevisiae*, tipo de aceite \times nivel de aceite y nivel de aceite \times *S. cerevisiae* también mostraron un incremento no significativo de la

PG *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) con el aumento ($P<0,05$) del periodo de incubación de 8 a 48h. Por otro lado, la interacción nivel de aceite \times *S. cerevisiae* reveló un impacto significativo ($P<0,05$) en la PG *in vitro* (mL/0,5g de MS degradada) hasta las 48h del periodo de incubación (Tabla 9).

Efecto de los aditivos sobre la emisión de CH₄

La Figura 6 muestra la emisión de CH₄ *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) con el aumento del periodo de incubación debido a la inclusión de aditivos en la dieta. La producción de CH₄ fue nula hasta las 10 horas de incubación. Sin embargo, el aceite de cártamo y el aceite de pescado tuvieron efecto ($P<0,05$) en la mitigación de la emisión de CH₄ con respecto a la dieta control. Asimismo, la emisión de CH₄ *in vitro* (mL/0,5g de MS degradada) se redujo ($P=0,005$) debido a la interacción nivel de aceite \times *S. cerevisiae*. La emisión proporcional de CH₄ se vio influida ($P<0,05$) a las 24 y 48h por la suplementación de aceites de cártamo y de pescado. Las interacciones entre raciones \times dosis mostraron un impacto no significativo en la emisión proporcional de CH₄ (Tabla 9).

Efecto de los aditivos sobre la emisión de CO₂

La emisión de CO₂ *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) con el aumento del periodo de incubación debido a la inclusión de aditivos en la dieta se muestra en la Figura 7. Tanto el tipo de ración como *S. cerevisiae* no tuvieron ningún efecto sobre la emisión de CO₂ (mL/0,5g MS incubada) con respecto al control. Por el contrario, la emisión de CO₂ (mL/0,5g MS degradada) se redujo ($P\leq 0,05$) debido a las interacciones tipo de aceite \times *S. cerevisiae* y nivel de aceite \times *S. cerevisiae*. Del mismo modo, la emisión proporcional de CO₂ se vio influida ($P<0,05$) hasta las 48 h debido a la interacción tipo de aceite \times *S. cerevisiae* (Tabla 11).

Efecto de los aditivos sobre la emisión de H₂

La Figura 8 muestra la emisión de H₂ *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) con el aumento (P<0,05) del periodo de incubación debido a la inclusión de aditivos en la dieta. La producción de H₂ *in vitro* (mL/0,5g MS incubada) aumentó ligeramente en los niveles de tratamiento con respecto al control. Por otra parte, la interacción tipo de aceite × *S. cerevisiae* reveló una mitigación significativa (P<0,05) en la producción de H₂ (mL/0,5g de MS degradada) sólo a las 8 y 12h de incubación. La emisión proporcional de H₂ no se vio influida por los aceites ni por *S. cerevisiae* en todos los periodos de incubación (Tabla 12).

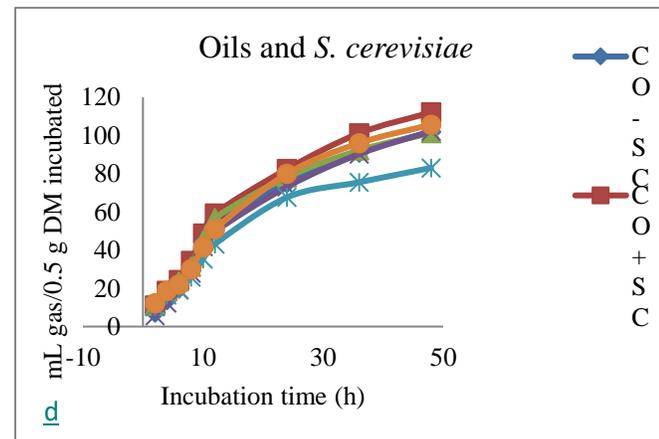
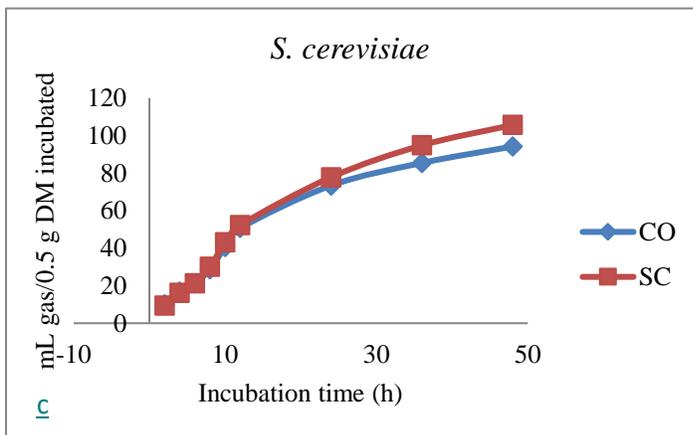
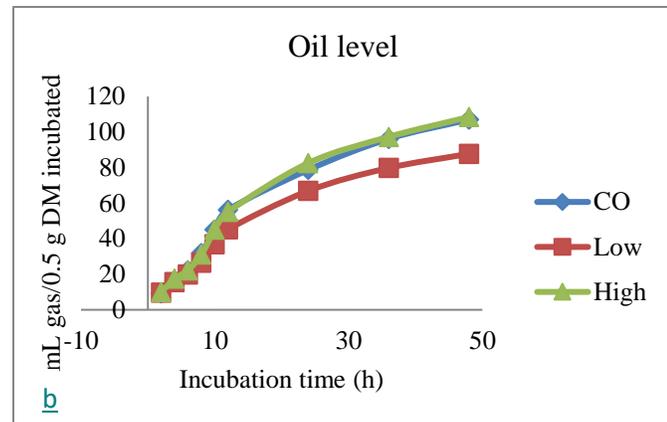
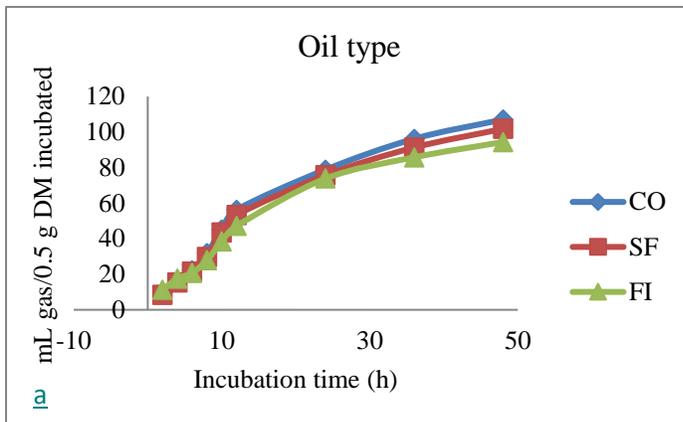


Figura 5: GP total en heces de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC.

Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0mg/g MS, y +SC = 4mg/g MS.

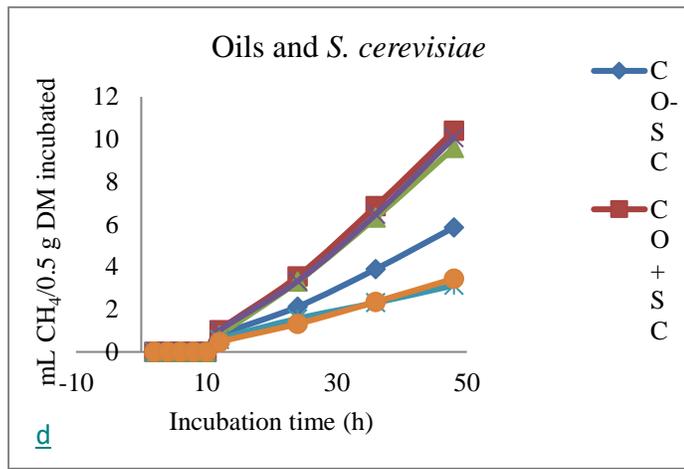
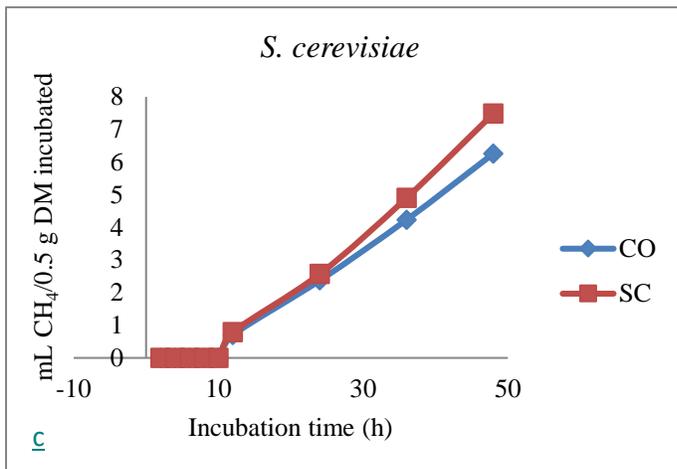
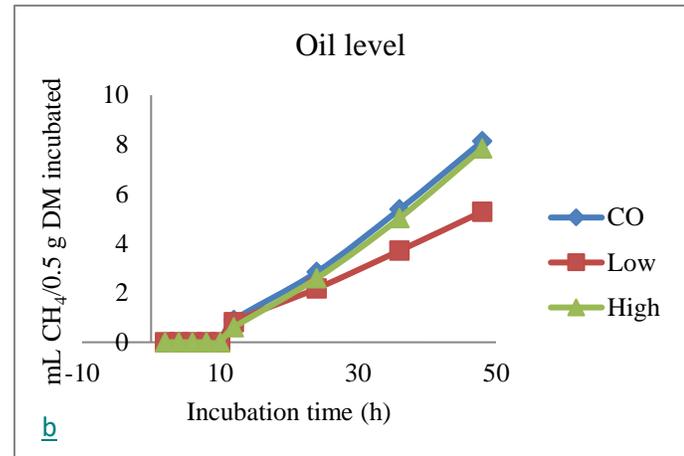
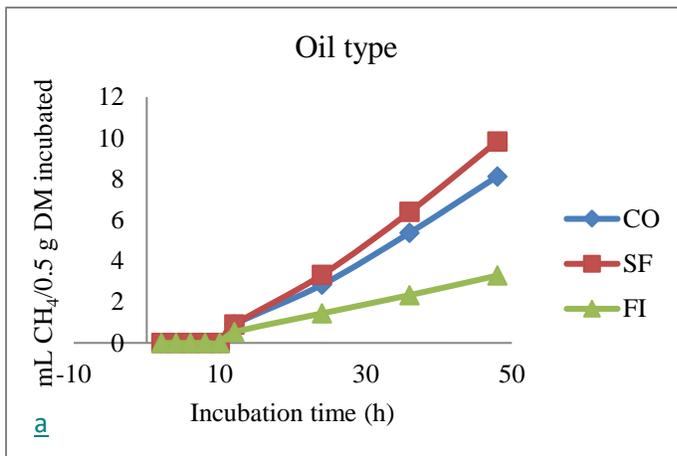


Figura 6: Producción de CH₄ fecal de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC.

Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0mg/g MS, y +SC = 4mg/g MS.

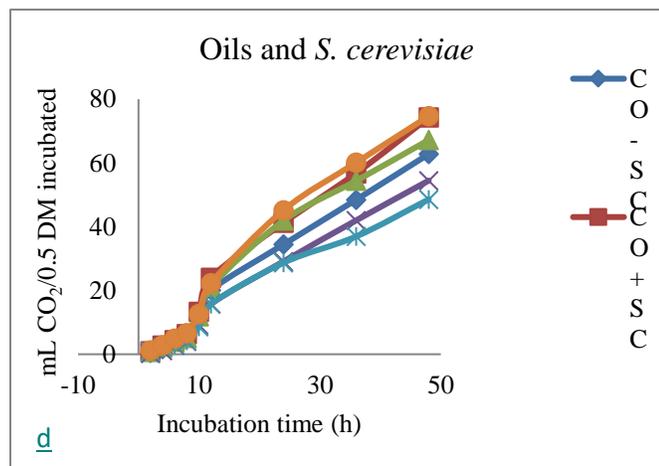
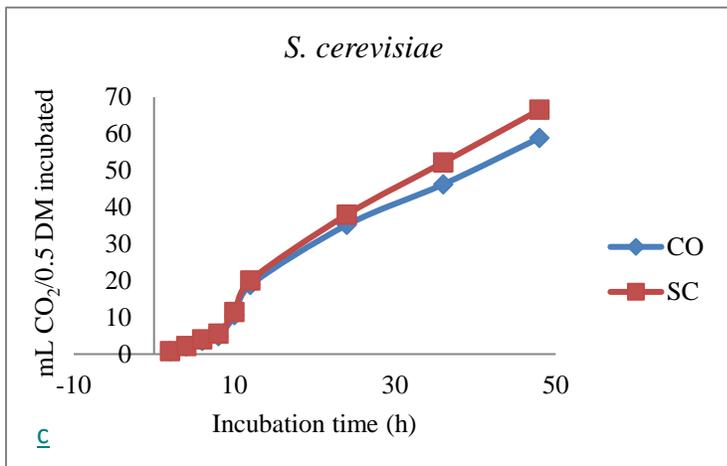
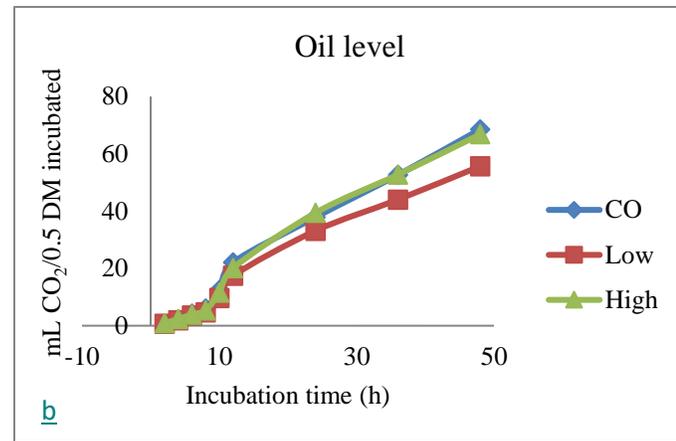
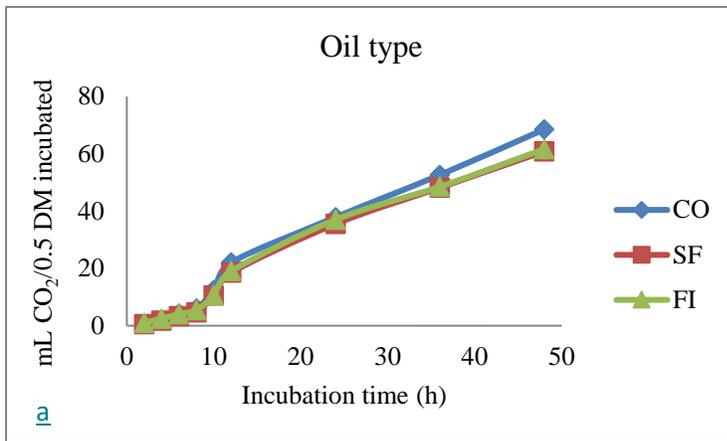


Figura 7: Producción de CO₂ fecal de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC.

Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0 mg/g MS, y +SC = 4 mg/g MS

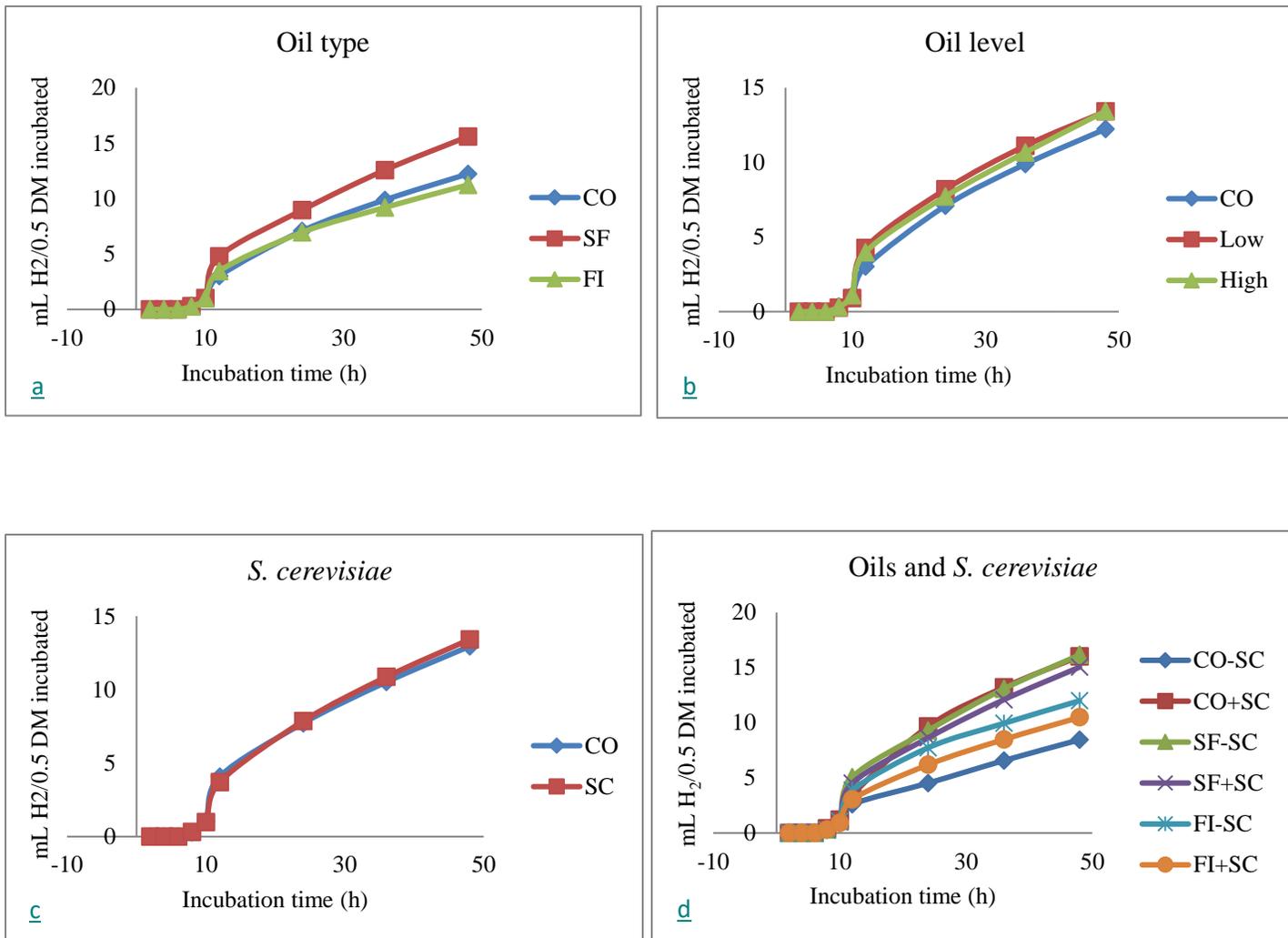


Figura 8: Producción de H₂ en heces de caballo (mL/0,5g MS) en diferentes periodos de incubación según la inclusión en la dieta de (a) aceites de cártamo (SF) y de pescado (FI) con respecto al control (CO), (b) dosis bajas y altas de aceites, (c) *S. cerevisiae* (SC), y (d) combinación de aceites y SC.

Dosis baja = 2,4% v/p, dosis alta = 4,8% v/p, -SC = 0mg/g MS, y +SC = 4mg/g MS

Tabla 7: Ingredientes de las dietas y composición de los aceites (Experimento 2)

	Safflower oil			Fish oil	
	Control	Low	High	Low	High
Ingredients (%)					
Oats	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Steam rolled corn	25.0	22.6	20.2	22.6	20.2
Steam rolled barley	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Wheat bran	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Corn gluten feed	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Soybean meal	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Type of oil	0.0	2.4	4.8	2.4	4.8
Molasses	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Vit/Min	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Soybean hulls	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Chemical ration composition (%)					
Dry matter	86.45	86.51	86.57	86.51	86.57
Crude fiber	9.43	9.37	9.31	9.37	9.31
Crude protein	13.4	13.18	12.97	13.18	12.97
Digestible energy (Mcal/kg)	3.38	3.5	3.62	3.51	3.64
Digestible crude protein (g/kg DM)	98.41	96.75	95.1	96.75	95.1
Ca	1.77	1.85	1.84	1.85	1.84
P	3.54	3.92	3.85	3.92	3.85
Mg	1.56	1.68	1.65	1.68	1.65
Na	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32
K	8.46	9.01	8.93	9.01	8.93
Cl	0.68	0.82	0.8	0.82	0.8
Zn	18.54	21.98	21.53	21.98	21.53
Cu	4.73	5.85	5.8	5.85	5.8

Fe			140.4	139.63	138.86	139.63	138.86
----	--	--	-------	--------	--------	--------	--------

Oils Composition ¹	Safflower oil	Fish oil
Energy (kcal)	884	902
Total fat (g)	100	100
Polyunsaturated fatty acids (g)	14.28	16
Monounsaturated fatty Acids (g)	78.57	57
Saturated fatty acids (g)	7.14	21

¹Proporcionado por el fabricante Oléico® Coral Internacional, S.A. de C.V., San Luis Potosí, México.

Tabla 8: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para piensos sobre la cinética de los gases totales, CH₄, CO₂ y H₂ *in vitro* fecal¹

Oil type	Oil level	SC	Total gas			CH ₄			CO ₂			H ₂		
			<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>
Control	0	-	96.6	0.060	2.77	8.6	0.209	15.47	62.8	0.036	6.87	8.2	0.036	9.58
		+	107.3	0.046	2.12	11.4	0.037	17.18	76.7	0.033	7.17	15.5	0.059	10.07
Safflower oil	Low	-	81.7	0.061	1.26	6.7	0.030	14.24	53.0	0.061	6.94	13.8	0.117	8.83
		+	88.6	0.046	1.35	12.2	0.033	18.30	52.2	0.028	7.13	20.0	0.039	11.29
	High	-	108.4	0.052	1.35	15.6	0.035	20.24	76.0	0.034	7.46	17.8	0.034	10.43
		+	103.8	0.064	3.28	10.5	0.039	17.50	61.7	0.034	10.41	9.5	0.039	9.53
Fish oil	Low	-	62.5	0.062	1.09	1.1	0.005	12.32	38.9	0.033	7.32	6.2	0.124	11.23
		+	106.3	0.033	3.81	16.6	0.028	13.76	75.7	0.037	7.68	11.3	0.042	10.36
	High	-	95.3	0.043	2.96	5.0	0.029	15.77	57.6	0.032	5.79	16.1	0.033	9.91
		+	98.8	0.048	1.88	3.8	0.023	18.52	70.1	0.037	6.90	8.7	0.045	9.32
Pooled SEM ²			33.03	0.0180	1.503	6.45	0.0752	2.966	20.91	0.0097	2.056	8.47	0.039	1.476
Additive effect ³ :														
Oil type (OT)			0.729	0.316	0.333	0.173	0.925	0.115	0.989	0.328	0.300	0.360	0.877	0.800
Oil level (OL)			0.239	0.883	0.446	0.907	0.958	0.035	0.272	0.266	0.716	0.963	0.078	0.392
SC			0.275	0.205	0.355	0.186	0.667	0.218	0.205	0.193	0.253	0.730	0.316	0.770
OT × SC			0.428	0.582	0.881	0.304	0.985	0.643	0.125	0.038	0.682	0.996	0.966	0.304
OT × OL			0.770	0.714	0.418	0.238	0.989	0.626	0.638	0.312	0.140	0.500	0.950	0.450
OL × SC			0.361	0.101	0.447	0.047	0.961	0.378	0.362	0.089	0.391	0.190	0.066	0.295

¹ *b* es la GP asintótica (mL/g MS); *c* es la tasa de GP (/h); *Lag* es el retraso inicial antes de que comience la GP (h)

² SEM es el error estándar de la media

³El valor de la interacción entre los tres factores experimentales no fue significativo (P>0,05)

0 = Sin aditivo, Bajo = 2,4% v/p, Alto = 4,8% v/p, - = 0mg/g MS, + = 4mg/g MS, SC = *S. cerevisiae*

Tabla 9: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para piensos en los parámetros de fermentación fecal *in vitro*, así como en la producción de gas total en diferentes periodos de incubación

Oil type	Oil level	SC	Fermentation parameters		Gas production mL/0.5g dry matter incubated				Gas production mL/0.5g dry matter degraded			
			pH	DMD ¹	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	6.5	19.7	29.3	53.3	75.1	102.0	11.4	21.1	30.2	41.1
		+	6.6	21.1	34.4	59.2	82.5	112.2	14.6	25.0	34.8	46.7
Safflower oil	Low	-	6.4	22.2	28.8	48.6	71.7	84.4	12.6	21.5	32.6	38.5
		+	6.5	22.0	27.8	46.9	63.2	93.7	12.1	20.7	27.5	40.6
	High	-	6.6	37.8	34.1	65.0	84.6	118.3	26.5	51.1	66.5	92.9
		+	6.5	20.0	28.2	52.7	83.2	110.9	11.6	21.7	34.3	45.1
Fish oil	Low	-	6.5	20.7	20.9	37.9	55.6	65.9	9.2	16.6	25.3	29.9
		+	6.6	26.9	28.6	47.7	77.2	107.0	16.9	27.4	42.1	57.7
	High	-	6.6	22.6	30.7	48.6	79.8	100.3	14.1	22.6	37.6	47.1
		+	6.6	17.7	31.5	54.5	82.9	104.5	11.0	19.7	29.7	37.1
Pooled SEM ²			0.14	5.60	9.50	16.75	28.36	33.49	6.47	12.21	19.16	23.52
Additive effect ³ :												
Oil type (OT)			0.229	0.121	0.660	0.376	0.873	0.606	0.257	0.131	0.364	0.217
Oil level (OL)			0.383	0.484	0.263	0.155	0.184	0.155	0.226	0.132	0.162	0.132
SC			0.537	0.143	0.568	0.699	0.593	0.306	0.621	0.438	0.507	0.635
OT x SC			0.876	0.035	0.351	0.284	0.459	0.452	0.055	0.048	0.113	0.085
OT x OL			0.876	0.024	0.668	0.866	0.948	0.740	0.165	0.090	0.160	0.092
OL x SC			0.370	0.003	0.357	0.289	0.286	0.231	0.017	0.029	0.077	0.020

¹DMD es la degradabilidad de la materia seca (%)

² SEM es el error estándar de la media

³El valor de la interacción entre los tres factores experimentales no fue significativo (P>0,05)

0 = Sin aditivo, Bajo = 2,4% v/p, Alto = 4,8% v/p, - = 0mg/g MS, + = 4mg/g MS, SC = *S. cerevisiae*

Tabla 10: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos alimentarios sobre la producción de CH₄ fecal *in vitro* en diferentes períodos de incubación

Oil type	Oil level	SC	mL CH ₄ /0.5g dry matter incubated				mL CH ₄ /0.5g dry matter degraded				% of CH ₄ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	0.00	0.77	2.12	5.86	0.00	0.30	0.84	2.34	0.00	1.35	2.68	5.34
		+	0.00	1.02	3.55	10.40	0.00	0.45	1.53	4.33	0.00	1.78	4.46	9.55
Safflower oil	Low	-	0.00	1.23	3.05	5.57	0.00	0.61	1.49	2.65	0.00	2.47	3.67	6.07
		+	0.00	1.08	3.41	10.90	0.00	0.53	1.59	4.99	0.00	2.10	5.23	11.50
	High	-	0.00	0.33	3.57	13.63	0.00	0.27	2.50	9.43	0.00	0.50	4.43	12.30
		+	0.00	0.93	3.25	9.26	0.00	0.42	1.34	3.63	0.00	1.53	4.07	9.13
Fish oil	Low	-	0.00	0.33	0.72	1.29	0.00	0.16	0.34	0.60	0.00	0.83	1.27	2.13
		+	0.00	0.61	1.51	3.38	0.00	0.34	0.85	1.91	0.00	1.07	1.73	3.07
	High	-	0.00	0.84	2.40	4.97	0.00	0.42	1.18	2.39	0.00	1.80	2.76	4.76
		+	0.00	0.32	1.13	3.51	0.00	0.11	0.43	1.28	0.00	0.57	1.37	3.38
Pooled SEM ¹			0.000	0.803	1.708	3.873	0.000	0.412	0.884	1.865	0.000	1.342	1.812	3.536
Additive effect ² :														
Oil type (OT)			0.00	0.312	0.015	0.002	0.00	0.249	0.007	0.0001	0.00	0.341	0.003	0.001
Oil level (OL)			0.00	0.569	0.577	0.203	0.00	0.546	0.421	0.070	0.00	0.398	0.818	0.331
SC			0.00	0.698	0.546	0.291	0.00	0.793	0.922	0.987	0.00	0.885	0.351	0.246
OT × SC			0.00	0.630	0.858	0.967	0.00	0.796	0.582	0.306	0.00	0.495	0.507	0.697
OT × OL			0.00	0.383	0.750	0.743	0.00	0.485	0.812	0.235	0.00	0.223	0.632	0.893
OL × SC			0.00	0.978	0.358	0.101	0.00	0.703	0.092	0.005	0.00	0.978	0.239	0.123

¹Estándar de error de la media

²El valor de la interacción entre los tres factores experimentales no fue significativo (P>0,05)

0 = Sin aditivo, Bajo = 2,4% v/p, Alto = 4,8% v/p, - = 0mg/g MS, + = 4mg/g MS, SC = *S. cerevisiae*

Tabla 11: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos alimentarios sobre la producción de CO₂ fecal *in vitro* en diferentes períodos de incubación

Oil type	Oil level	SC	mL CO ₂ /0.5g dry matter incubated				mL CO ₂ /0.5g dry matter degraded				% of CO ₂ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	5.55	20.09	34.47	62.81	2.15	7.97	13.89	25.35	19.54	37.87	45.94	61.78
		+	6.37	24.04	41.23	74.27	2.66	9.96	17.04	30.30	19.17	40.42	49.23	65.64
Safflower oil	Low	-	4.84	19.06	40.28	57.54	2.14	8.50	18.76	26.66	18.67	40.33	54.67	67.00
		+	4.85	16.02	25.00	50.27	2.20	7.24	10.95	21.85	17.67	34.33	39.77	53.77
	High	-	5.48	23.45	43.64	76.91	3.96	18.58	33.22	58.84	16.67	36.00	52.33	66.00
		+	3.34	15.58	33.25	58.70	1.40	6.51	13.90	23.99	11.33	28.87	37.53	51.90
Fish oil	Low	-	2.41	12.07	21.15	38.09	1.10	5.33	9.49	17.33	11.33	30.67	39.73	57.73
		+	6.66	22.56	46.08	76.82	3.84	12.65	25.36	42.11	24.67	48.33	60.67	72.20
	High	-	5.98	19.44	36.29	59.07	2.74	8.99	17.00	27.69	17.70	36.37	42.70	56.03
		+	6.71	22.12	44.35	72.58	2.19	7.46	15.27	25.51	22.33	43.00	55.00	70.67
Pooled SEM ¹			2.263	7.257	14.897	21.778	1.205	4.922	9.607	15.250	6.423	7.545	8.983	7.887
Additive effect ² :														
Oil type (OT)			0.404	0.870	0.831	0.939	0.929	0.413	0.511	0.425	0.295	0.163	0.400	0.325
Oil level (OL)			0.482	0.399	0.352	0.283	0.610	0.317	0.318	0.234	0.699	0.480	0.656	0.737
SC			0.321	0.526	0.522	0.308	0.808	0.615	0.629	0.728	0.363	0.289	0.611	0.677
OT x SC			0.074	0.067	0.063	0.065	0.022	0.018	0.008	0.011	0.034	0.007	0.000	0.003
OT x OL			0.252	0.816	0.946	0.788	0.609	0.167	0.180	0.088	0.269	0.447	0.909	0.984
OL x SC			0.151	0.328	0.655	0.382	0.005	0.015	0.05	0.019	0.245	0.364	0.601	0.969

¹Estándar de error de la media

²El valor de la interacción entre los tres factores experimentales no fue significativo (P>0,05)

0 = Sin aditivo, Bajo = 2,4% v/p, Alto = 4,8% v/p, - = 0mg/g MS, + = 4mg/g MS, SC = *S. cerevisiae*

Tabla 12: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para piensos sobre la producción *in vitro* de H₂ fecal en diferentes periodos de incubación

Oil type	Oil level	SC	mL H ₂ /0.5 dry matter incubated				mL H ₂ /0.5 g dry matter degraded				% of H ₂ production			
			8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
Control	0	-	0.29	2.59	4.52	8.45	0.11	1.00	1.78	3.35	1.00	5.17	6.25	8.42
		+	0.41	3.45	9.66	16.02	0.17	1.44	4.52	7.38	1.17	6.00	11.67	14.92
Safflower oil	Low	-	0.29	5.09	10.03	14.61	0.13	2.43	4.87	7.09	1.00	10.33	12.00	14.67
		+	0.28	6.07	11.57	20.31	0.12	2.86	5.46	9.40	1.00	12.00	18.00	22.00
	High	-	0.34	5.03	8.58	17.71	0.26	3.58	6.00	12.16	1.00	8.00	10.67	16.00
		+	0.28	2.96	5.68	9.79	0.12	1.21	2.32	3.95	1.00	5.67	6.67	8.67
Fish oil	Low	-	0.21	2.61	4.49	7.01	0.09	1.07	1.95	3.05	1.00	6.67	8.33	11.00
		+	0.29	3.29	6.69	11.73	0.17	2.03	3.94	6.74	1.00	7.00	9.33	11.33
	High	-	0.31	5.13	10.96	16.99	0.14	2.46	5.31	8.17	1.00	10.00	12.00	15.00
		+	0.32	2.81	5.68	9.25	0.11	0.96	1.99	3.23	1.00	5.33	7.00	9.00
Pooled SEM ¹			0.107	2.343	5.931	8.894	0.068	1.274	3.286	4.872	0.039	4.065	6.852	7.934
Additive effect ² :														
Oil type (OT)			0.765	0.147	0.592	0.422	0.322	0.072	0.506	0.341	1.000	0.277	0.550	0.479
Oil level (OL)			0.441	0.752	0.900	0.997	0.290	0.921	0.942	0.917	1.000	0.277	0.526	0.625
SC			0.414	0.739	0.798	0.753	0.916	0.409	0.987	0.973	0.458	0.603	0.716	0.821
OT x SC			0.522	0.879	0.908	0.971	0.091	0.476	0.830	0.696	1.000	0.567	0.737	0.789
OT x OL			0.769	0.153	0.393	0.492	0.222	0.674	0.678	0.868	1.000	0.112	0.434	0.519
OL x SC			0.626	0.099	0.427	0.232	0.035	0.009	0.247	0.113	1.000	0.164	0.372	0.323

¹Estándar de error de la media

²El valor de la interacción entre los tres factores experimentales no fue significativo (P>0,05)

0 = Sin aditivo, Bajo = 2,4% v/p, Alto = 4,8% v/p, - = 0mg/g MS, + = 4mg/g MS, SC = *S. cerevisiae*

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Experimento 1:

Influencia de la inclusión en la dieta de aceites de maíz y soya, en combinación con el cultivo de levadura viva, en la producción de metano, dióxido de carbono e hidrógeno en las heces de los caballos. Sin embargo, no hay mucha preocupación por la necesidad de reducir las emisiones de metano de los equinos. Esto puede deberse en parte al hecho de que el principal sumidero de metano en los equinos es la acetogénesis y no la metanogénesis, lo que hace que los equinos emitan menos metano en comparación con otros herbívoros con estómago de cuatro compartimentos.

El tiempo de retardo es una medida del tiempo necesario para que los microbios del intestino inicien la digestibilidad del alimento. Es importante saber que la digestibilidad es una indicación de la adaptabilidad de los microbios a la digesta y al entorno, lo que es una evidencia de un sustrato y un entorno favorables. El resultado demostró que el alto nivel de aceite creó un entorno favorable, por lo que el tiempo requerido para la producción de gas fue menor. Esta producción de gas indica que el alto nivel de aceite podría ayudar a los animales a tener acceso a los nutrientes de los piensos en un periodo corto. Además, el aceite de maíz en el nivel alto fue el que más tiempo requirió para la producción de CO₂, que es uno de los componentes de los gases de efecto invernadero para el calentamiento global. Por el contrario, el aceite de soya en el nivel alto fue el que menos tardó en producir CO₂. Esto implica que el aceite de soya tenía una menor capacidad de inhibición del CO₂, mientras que el aceite de maíz podía inhibirlo mejor. Sin embargo, esto no ofrece una imagen mejor. Un examen de la producción de gas CO₂ mostró que, aunque el aceite de maíz en el nivel alto tenía un retraso en la producción de CO₂, en realidad producía más CO₂ en comparación con el aceite de soya alto, que tenía la producción de CO₂

más rápida. Esto significa que, a largo plazo, los microbios del aceite de maíz se adaptaron al aceite y produjeron más gas, mientras que el aceite de soya inhibió el CO₂ a pesar de la rápida tasa de producción de gas (Elghandour et al., 2017) (Elghandour et al., 2016; Girón et al., 2016). Esto apunta a la capacidad inherente del aceite de soya para reducir la producción de CO₂ en comparación con el aceite de maíz. Por lo tanto, en lo que se refiere a la emisión de gases de efecto invernadero en el ganado, el tiempo requerido para producirlo puede no ser una medida correcta absoluta del impacto de los aditivos, más bien, que la cantidad que fueron capaces de inhibir, porque el retraso inicial puede ser debido a la adaptación más que a la inhibición (Ferraro et al., 2016; Elghandour et al., 2016; Girón et al., 2016).

El bajo pH con la inclusión de aceite de maíz bajo es un testimonio más de la digestibilidad, que habría dado lugar a una mayor producción de ácidos grasos volátiles (Vallejo et al., 2016). Por el contrario, la producción de gas/MS degradado mostró que el tipo de aceite, y el tipo de aceite (OT) x el nivel de aceite (OL), afectaron al gas producido en 24h. La mayor producción de gas se registró cuando se utilizó un nivel alto de aceite de soya, mientras que la menor fue la producida cuando se utilizó un nivel alto de aceite de maíz. Esto implica que el alto nivel de aceite de soya aumentó la digestibilidad y creó un entorno microbiano propicio que favoreció la digestibilidad (Velázquez et al., 2016). En consecuencia, el alto nivel de aceite de soya no fue tóxico para los microbios y éstos fueron capaces de adaptarse a él para favorecer la digestibilidad de la materia orgánica y la digestibilidad de los carbohidratos de la pared celular (Hernández et al., 2017).

Ni el tipo de aceite (OT) ni el nivel de aceite (OL) influyeron ($P > 0,05$) en la producción de metano. El nivel alto de aceite de maíz produjo el menor metano, mientras que el nivel bajo de aceite de maíz produjo el mayor en 12 y 24h de incubación. Se puede convenir en que un nivel alto de aceite de maíz es tóxico para los metanógenos (antimetanógenos) y los microbios productores de hidrógeno o, tal vez, como se informó en (Abubakr et al., 2012) los C12:0 y C14:0 de cadena media son tóxicos para los protozoos. Esta toxicidad para los protozoos podría haber

reducido el hidrógeno disponible para la formación de metano por parte de los metanógenos (Abubakr et al., 2012).

Además, se observó una disminución dependiente del tipo de aceite en la producción de CO₂/MS degradado. El nivel alto de aceite de maíz fue el que menos produjo, lo que es contrario al más alto producido bajo el nivel alto de aceite de soya en 24h. El CO₂ producido cuando se utilizó el nivel alto de aceite de soya fue 2,55 veces mayor que el producido por la inclusión alta de aceite de maíz. Por un lado, esto podría significar que el aceite de maíz alto aumenta el CO₂ disponible para la producción de ácidos grasos volátiles, lo que hace que la energía esté más disponible para los equinos (Hernández et al., 2017; Salem et al., 2015). Sin embargo, podría ser que el nivel alto de aceite de maíz redujera la digestibilidad y, por tanto, la disponibilidad de CO₂. La segunda opción parece razonable porque los datos muestran que el aceite de maíz en su nivel alto produjo la menor DMS.

Una de las funciones de la levadura en el intestino del ganado es la estabilidad del pH; se observó que la levadura no tuvo un efecto significativo ($P>0,05$) en la producción de gas, CH₄, CO₂ y H₂. La inclusión de la levadura ayudó a aumentar el pH durante la fermentación (Elghandour et al., 2016a; Elghandour et al., 2016b) (Girón et al., 2016). El aumento del pH o la estabilidad es uno de los beneficios de las levaduras en el ganado. Ayudan a amortiguar el ambiente interno para reducir el impacto de la acidez mediante la neutralización (Mohammadabadin et al., 2018). Esto concuerda con el estudio de Elghandour et al. (2016) de que las levaduras ayudan a aumentar el pH del intestino. El aumento del pH podría ser el resultado de la capacidad de la levadura para disminuir el ácido láctico o aumentar las bacterias que lo utilizan (Weese, 2002; Elghandour et al., 2016).

La suplementación con lípidos es un método de manipulación del entorno fermentativo para mejorar la digestibilidad y la producción. Una de las principales funciones de la suplementación de lípidos se ha atribuido a su cadena de ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena media y los ácidos grasos poliinsaturados, más que los compuestos bioactivos, están asociados a su función. Además, Marounek et al. (2002) y Abubakr et al. (2012) han atribuido la toxicidad del ácido

graso a las bacterias y los protozoos. El aceite de maíz sin inclusión de levadura dio lugar a la mayor DMS, lo que indica el grado de descomposición de la materia orgánica por parte de los microorganismos y una adaptación al entorno o ambiente favorable. El aceite de maíz no fue tóxico para los microbios ni para la adaptación microbiana. Esto implica que los microbios pueden adaptarse fácilmente cuando se utiliza el aceite sin que sea tóxico para ellos, en comparación con el aceite de soya o con un alto nivel de aceite de maíz (Elghandour et al., 2016). El aumento del porcentaje de DMS también tiene implicaciones positivas y beneficiosas para los ácidos grasos volátiles y la disponibilidad de energía para los animales (Girón et al., 2016). La ruptura de la pared celular es esencial para la evaluación de los nutrientes, por lo que el uso de un nivel bajo de aceite de maíz sin levadura o, alternativamente, un nivel alto de aceite de soya con levadura podría utilizarse para aumentar la DMS sin alterar el pH del intestino y, por tanto, reducir la incidencia de la acidosis.

Experimento 2:

Mitigación sostenible de la emisión de gases fecales de efecto invernadero de los equinos mediante el uso de aceites de cártamo y de pescado en combinación con un cultivo de levadura viva como aditivos para lograr un ecosistema más limpio

La mejora de la eficiencia y la productividad del ganado a través de una manipulación dietética influyente se considera un enfoque sustancial para la mitigación de los gases de efecto invernadero (GEI) de los animales. De hecho, una gran parte de la energía de los animales se destina a la obtención de productos valiosos debido a la mejora de la eficiencia de la producción, reduciendo así la emisión de gases perjudiciales por unidad de producto (Kataria, 2015). Se sabe que la calidad del forraje afecta al rendimiento de GEI en el ganado. En general, el forraje de alta calidad consiste en sacáridos fermentables y un nivel reducido de fibra detergente neutra, lo que conduce a una alta digestibilidad, así como a una tasa de paso, mitigando así la producción de emisiones de CH₄, CO₂ y H₂ al cambiar las vías de fermentación (Beever et al., 1986). Las variaciones en la composición química de los distintos piensos también son responsables de reducir la producción

de GEI en los animales. Actualmente, en los países en desarrollo, el ganado se alimenta con dietas de baja digestibilidad y composición nutricional. Sin duda, esto tiene implicaciones globales y conduce a una mayor emisión de GEI. Teniendo en cuenta los hechos mencionados, en el presente estudio se utilizaron aceite de cártamo y de pescado con alta energía digestible, proteína bruta digestible y nivel de energía como aditivos dietéticos en la alimentación, no sólo para mejorar la eficiencia sino también para reducir la producción de GEI en los caballos. Por otra parte, se sabe que las levaduras mejoran el recuento total de la microbiota del intestino posterior, lo que se traduce en una mejor digestibilidad del forraje (Morgan, 2006). En vista de ello, intentamos evaluar la capacidad de fermentación de los aceites junto con distintas dosis de *S. cerevisiae*.

La producción de gas (PG) asintótica, la tasa de PG y el periodo de retardo no se vieron afectados por la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae*. Las interacciones entre el tipo de aceite y *S. cerevisiae*, el tipo de aceite y el nivel de aceite, y el nivel de aceite y *S. cerevisiae* tampoco mostraron un impacto significativo en la PG asintótica, la tasa de PG y el periodo de retardo. El crecimiento microbiano y la liberación de enzimas digestivas afectan a la potencia fermentativa de diversos componentes del pienso (Getachew et al., 2004). Ferraro et al. (2016) mostraron un aumento de la tasa de PG debido a la suplementación con glicerol, propilenglicol y melaza. El aumento del tiempo de PG al suplementar aceites y *S. cerevisiae* sugiere las estrategias de adaptación retardada de la microbiota hacia las dietas. Nuestros resultados coinciden con los de Ferraro et al. (2016), que demostraron que los suplementos energéticos en la dieta del ganado estimulaban la adaptación microbiana y reducían el periodo de retardo.

La interacción nivel de aceite x *S. cerevisiae* mostró una reducción significativa de la producción asintótica de CH₄. Las interacciones tipo de aceite y *S. cerevisiae*, y tipo de aceite y nivel de aceite mostraron un impacto no significativo en la tasa de emisión de CH₄. Por otra parte, el aceite de cártamo y el aceite de pescado al 2,4 y al 4,8% v/p mostraron una influencia significativa en el periodo de retardo de la producción de CH₄. Una observación más o menos similar a nuestros resultados fue

reportada por Elghandour et al. (2016), quienes revelaron la falta de impacto de la ración en la tasa de emisión de CH₄ y el período de retardo de la emisión. Además, los autores revelaron la falta de efecto de la interacción tipo de ración x dosis en la producción de CO₂. En este estudio, las interacciones tipo de aceite x *S. cerevisiae*, tipo de aceite x nivel de aceite y nivel de aceite x *S. cerevisiae* mostraron falta de efecto no solo en la asíntota, la tasa y el tiempo de retardo de la emisión de CO₂ sino también de H₂. En la actualidad, no se dispone de informes que investiguen el papel sinérgico del aceite de cártamo, el aceite de pescado y *S. cerevisiae* en la cinética del CO₂ y el H₂ en el ganado; por lo tanto, no se puede discutir la comparación entre nuestros hallazgos y los informes anteriores.

La suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae* en distintas concentraciones no mostró un impacto significativo sobre el nivel de pH y la DMS. Elghandour et al. (2016a) y Lattimer et al. (2007), que no obtuvieron ninguna alteración en el pH y la DMS mediante la suplementación de levadura en la dieta de alto concentrado, mostraron observaciones similares. Por el contrario, Hernández et al. (2017) demostraron una reducción significativa del pH y de la DMS *in vitro* al suplementar la dieta con aceite de ajo. La variación observada en este contexto podría deberse al alto rasgo de amortiguación del mecanismo fermentativo y al diferente modo de acción de los aceites, así como de *S. cerevisiae* sobre la microbiota (Elghandour et al., 2016b).

La degradación efectiva del alimento se mide mediante la estimación de la PG *in vitro*. Generalmente, los valores altos de gas son indicación de una mejor disponibilidad nutricional para la microbiota (Elghandour et al., 2017; Elghandour et al., 2018; Pedraza-Hernández et al., 2019). En esta investigación, se estimó que la PG *in vitro* (mL/0,5g de MS incubada) se incrementó debido a la suplementación de aceites y levaduras. Las interacciones tipo de aceite x *S. cerevisiae*, tipo de aceite x nivel de aceite y nivel de aceite x *S. cerevisiae* también mostraron un incremento de la PG *in vitro* con el aumento del periodo de incubación. Los resultados del presente estudio coinciden con el informe de Hernández et al. (2017), que demostró

un aumento significativo de la PG *in vitro* debido a la adición de *S. cerevisiae* en la dieta de alto concentrado de los terneros lecheros.

Los suplementos de aceite se implementan en la dieta no sólo para lograr los requisitos de alta energía, sino también para reducir la producción de CH₄ en los animales (Martin et al., 2010). En un informe anterior, Hollmann et al. (2012) demostraron la potencia única de los ácidos láurico y mirístico para mitigar la emisión de CH₄ en las vacas lecheras. Asimismo, la suplementación de aceites vegetales enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados mostró una reducción significativa de la producción de CH₄ en el ganado en crecimiento (Beauchemin y McGinn, 2006) y en las vacas lactantes (Martin et al., 2010). En el presente contexto, emprendimos un nuevo intento de evaluar la potencialidad del aceite de cártamo y de pescado para reducir la producción de CH₄ en el caballo. Los resultados mostraron el significativo efecto sinérgico del aceite de cártamo, el aceite de pescado y *S. cerevisiae* en la mitigación de la emisión de CH₄ con respecto a la dieta de control en el caballo. La producción de CH₄ fue nula hasta las 10 horas de incubación. Elghandour et al. (2016c) también informaron de una observación similar y estimaron una emisión insignificante de CH₄ al principio del período de incubación debido a la suplementación aditiva. En otro estudio, la suplementación de aceite de girasol en la dieta del ganado mostró una reducción del 22% en la producción de CH₄ (McGinn et al., 2004). La variación en la tasa de mitigación de la emisión de CH₄ podría deberse a la reducción de la digestibilidad de la materia orgánica, la alta formación de ácido propiónico, el tipo y la composición de los aceites y la inhibición del crecimiento de la microbiota (Martin et al., 2010).

En el presente estudio, el tipo de ración y *S. cerevisiae* no revelaron un impacto significativo en la emisión de CO₂ (mL/0,5g de MS incubada) con respecto al control. Por el contrario, la emisión de CO₂ (mL/0,5g de MS degradada) se atenuó debido a las interacciones tipo de aceite × *S. cerevisiae* y nivel de aceite × *S. cerevisiae*. Nuestros informes coinciden parcialmente con los hallazgos de Hernández et al. (2017), quienes observaron un mayor CO₂ en la dieta control que en la de los tratamientos con aceite. La tendencia a la reducción de la emisión de CO₂ al variar

el periodo de incubación podría deberse a la estimulación de la capacidad de supervivencia de los microbios productores de propionato. De hecho, las levaduras desplazan la utilización de H₂ de la metanogénesis para reducir la acetogénesis por parte de los microbios homoacetogénicos que liberan acetato a partir de CO₂ y H₂ (Mwenya et al., 2004), disminuyendo así la producción de CO₂. Por el contrario, Elghandour et al. (2016b) demostraron que la levadura en diferentes dosis no tenía una influencia significativa en la emisión de CO₂. Además, en nuestra investigación, la interacción tipo de aceite × *S. cerevisiae* mostró una reducción significativa en la producción de H₂ (mL/0,5g de MS degradada) hasta las 12h de incubación. Teniendo en cuenta la falta de estudios que investiguen el papel sinérgico fundamental de los aceites y las levaduras en la mitigación de la producción de H₂ del caballo, los resultados obtenidos en este contexto no han podido ser comparados a la luz de informes anteriores.

IX. CONCLUSIONES

Se puede concluir los siguientes de los dos experimentos desarrollados en esta tesis doctoral, En el **primer experimento**, no existe una solución única para problemas como la digestibilidad y la emisión de gases de efecto invernadero en la producción ganadera. Con el fin de mejorar el tiempo requerido para la digestión, que es una indicación de la adaptación microbiana, se puede utilizar el alto nivel de aceite de soya para reducir el tiempo requerido por los microbios para la digestibilidad. La inclusión de aceite de soya con levadura ayudaría a aumentar y estabilizar el pH del intestino, reduciendo así la incidencia de las alteraciones microbianas. La emisión de gases de efecto invernadero en los equinos puede reducirse suplementando la dieta de los équidos con un alto nivel de aceite de maíz para reducir la emisión de los equinos en un 44,5, 36,0 y 54,6% para el CH₄, el CO₂ y el H₂ respectivamente. Sin embargo, para obtener un rendimiento combinado, como la digestibilidad, el pH y la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, puede recomendarse el aceite de soja.

En el **segundo experimento**: la adición de aceite de cártamo, aceite de pescado y la levadura, no exhibieron algún efecto significativo sobre la asintótica de la producción de gas (PG), tasa de PG y en el periodo de retardo. La producción asintótica de CH₄ fue reducida debido a la interacción del tipo de aceite x *S. cerevisiae*. Los aditivos mostraron no tener influencia sobre la asintótica, la tasa y el tiempo de retardo en las emisiones de CO₂ e H₂. Por otro lado, el aceite de cártamo, el aceite de pescado y la levadura, revelaron un impacto significativo sobre la mitigación en las emisiones del CH₄, CO₂ y el H₂. Concisamente, los aceites dietéticos (2.4 y 4.8% v/p) y la levadura (4mg/g MS) pueden ser utilizados para mitigar las emisiones *in vitro* de los gases antes mencionados en caballos. Mas adelante, se requiere de estudios *in vivo* para representar la eficiencia de estos suplementos para mantener una gran preocupación por las emisiones de gases de efecto invernadero del ganado.

X. LITERATURA CITADA

- Abubakr AR, Alimon AR, Yaakub H, Abdullah N, Ivan M. Digestibility, rumen protozoa, and ruminal fermentation in goats receiving dietary palm oil byproducts. *J Saudi Soc Agric Sci* 2012;12:147e54.
- Aman P., Hesselman K., Tilly A.C., 1985. The variation in chemical composition of Swedish barleys. *Journal of cereal science* 3, 73-77.
- AOAC. Official methods of analysis. 17th ed. Arlington, VA:Association of Official Analytical Chemists; 2000.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis. 16th ed. Arlington, VA: AOAC; 1997.
- Axelsson J., 1943. Hastanas utfodring ococh/skotsel. *Nordisk Rotogravyr*, Stockholm.
- Bailey SR., Marr CM., Elliot J., 2004. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Veterinary Journal* 167, 129-142.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84, 1489e1496.
- Beever, D.E., Dhanoa, M.S., Losada, H.R., Evans, R.T., Cammell, S.B., France, J., 1986. The effect of forage species and stage of harvest on the processes of digestion occurring in the rumen of cattle. *Br. J. Nutr.* 56, 439e454.
- Beyer M., 1998. Colic. In Pagan JD (Ed), *Advances in Equine Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham UK, Pp. 483-488.
- Biddle, A.S., Black, S.J., Blanchard, J.L., 2013 An in vitro model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. *PLoS ONE* 8 (10), e77599, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.phone.0077599>.
- Boadi, D.A., Wittenberg, K.M., 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the Sulphur hexafluoride (sf6) tracer gas technique. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 201e206.
- Bodirsky, B.L., Rolinski, S., Biewald, A., Weindl, I., Popp, A., Lotze-Campen, H., 2015. Global food demand scenarios for the 21st century. *PloS One* 10, e0139201.
- Bullimore SR., Pagan JD., Harris PA., et al, 2000. Carbohydrate supplementation of horses during endurance exercise: comparison of fructose and glucose. *Journal of Nutrition.* 130, 1760-1765.
- Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids^{1,2}. *J Nutr* 2012;14:592e9.
- Colville, T., Bassert, J.M., 2008. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*, 2nd ed., Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Cunha, T.J., 1991. *Horse feeding and nutrition*, 2nd ed., Academic Press, Inc., San diego, California.
- Degussa, 1996. The aminoacid composition of feedstuffs. Degussa AG., Frank-furt am Main, Germany.
- Domínguez-Vara IA, Sanchez-Malvaez E, Medina-Navarro P, de Oca-Jimenez RM, Vieyra Alberto R, Morales-Almaraz E, de la Fuente JL, Sanchez-Torres JE, Borquez-Gastelum JL, Acosta-Dibarrat J, Salem AZM. Mineral status and interrelationship in soil, forage, and blood serum of horses in the rainy and dry seasons. *J Equine Vet Sci* 2017;49:101e7.
- Dunnett CE., Marlin DJ., Harris RC. 2002. Effect of dietary lipid on response to exercise: relationship to metabolic adaptation. *Equine Vet. J. Suppl.* 34 (2002) 75-80
- Duren, S. Feeding the endurance horse. *Kentucky Equine Research.* 2:351-363, 2000.
- Duren, SE., 1990. Blood Fow distribution in Fasted and fed ponies at rest and durin endurance exercise. Ph. D. dissertation, University of Kentucky.
- Elghandour MMY, Adegbeye MJ, Barbabosa-Pilego A, Perez NR, Hernandez SR, Zaragoza-Bastida A, Salem AZM. Equine contribution in methane emission and its mitigation strategies. *J Equine Vet Sci* 2019;72:56e63.
- Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, Olafadehan OA, Kholif AM. Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. *J Clean Prod* 2016;139:1362e9.
- Elghandour MMY, Mellado M, Kholif AE, Salem AZM, Barbabosa A, Ballinas S. Fecal gas production of ten common horse feeds supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Equine Vet Sci* 2016;47:1e8.

- Elghandour MMY, Vallejo LH, Salem AZM, Salem MZM, Camacho LM, Buendía GR, et al. Effects of Schizochytrium microalgae and sunflower oil as sources of unsaturated fatty acids for the sustainable mitigation of ruminal biogases methane and carbon dioxide. *J Clean Prod* 2017;168:1389e97.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Lopez, S., Mendoza, G.D., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2016b. In vitro gas, methane, and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. *J. Equine Vet. Sci.* 38, 64e71.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Montes de Oca, R., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., et al., 2016a. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194e200.
- Elghandour, M.M.Y., Khusro, A., Greiner, R., Salem, A.Z.M., de la Fuente, J.L., Marquez-Molina, O., et al., 2018. Horse fecal methane and carbon dioxide productions and fermentation kinetics influenced by *Lactobacillus farciminis* supplemented diet. *J. Equine Vet. Sci.* 62, 98e101.
- Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Khusro, A., Cipriano-Salazar, M., Olivares-Perez, J., Barros-Rodriguez, M.A., et al., 2017. Assessment of some browse tree leaves on gas production and sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions in dairy calves at different age. *J. Clean. Prod.* 162, 1192e1199.
- Elghandour, M.M.Y., Vazquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Cipriano, M.M., Camacho, L.M., 2016c. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* 45, 389e395.
- Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutierrez CG. In vitro ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses combined with forages and their effect on glucose and insulin blood plasma concentrations after an oral drench in sheep. *Anim Feed Sci Technol* 2016;123:74e80.
- Fonnesback, P.V., 1968. Digestion of soluble and Fibrous carbohydrates of forages by Horses. *Journal of Nimal Science* 27, 1336-1344.
- Fonnesback, P.V., 1969. Partitioning the nutrients of forage for horses. *Journal of Animal Science* 28, 624-638.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., Lopez, S., Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* 83, 143e150.
- Frape, D., 2010. *Equine Nutrition and Feedin*, 4th ed., Willey Blackwell, Cichester, West Sussex, UK.
- Gallagher, K., Leech, J., Stowe H., 1992. Protein, energy and dry matter consumption by racing Standarbreds-a field survey. *Journal of Equine Veterinary Science* 12, 382-388.
- Garcia A.E., 2007. Importancia de los concentrados de levadura viva (*Sacharomyces cerevisiae*) en el desempeño productivo y la calidad de la canal de bovinos de engorda.
- Garcia R.S., 2001. Las levaduras para la alimentación de los cerdos (*Sacharomyces cerevisiae*). Publicado en www.engormix.com
- Geelen SNJ , M.M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, A.C. Beynen. 1999. Dietary fat supplementation and equine plasma lipid metabolism. *Equine Vet. J. Suppl* 30 (1999) 475-478
- Geelen SNJ, Blazquez C., Huelen MJH, Sloet van Oldruitenborh-Oosterbaan, Beynen AC (2001). High fat intake lower hepatic fatty acid synthesis and raises fatty acids oxidation in aerobic muscle in Shetland ponies. *Brit. J.Nutr.* 86 31-36
- Geor, R., J., 2010. Digestive strategy and flexibility in horses with reference to dietary carbohydrates. In: Ellis, A.D., Longland, A.C., Coenen, M., Miraglia, N. (Eds.), *The impact of nutrition on the health and welfare oh horses*, Wageningen Academic Publishers, Wagenen, The Netherlands.
- Gerber P, MacLeod M, Opio C, Vellinga T, Falcucci A, Weiler V, et al. Greenhouse gas emissions from livestock food chains: a global assessment. Bratislava: EAAP; 2012.
- Getachew, G., DePeters, E.J., Robinson, P.H., 2004. In vitro gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *Calif. Agric.* 58, 1e12.
- Giron JEP, Restrepo MLP, Carulla JEP, Fornaguera. Supplementation with corn oil and palm kernel oil to grazing cows: ruminal fermentation, milk yield, and fatty acid profile. *R Bras Zootec* 2016;45:693e703.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. *Forage Fibre Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications)*. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC, USA.

- Greiwe K.M, Meacham T.N., Fontenot J.P. 1989. Effect of added dietary fat on exercising horses. Proc. Of the 11 th. Equine Nutrition and Physiol. Symp. Stillwater OK, pp 101-106.
- Haque, M.N., 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *J. Anim. Sci. Technol.* 60, 15.
- Hernandez A, Kholif AE, Elghandour MMY, Camacho LM, Cipriano MM, Salem AZM, et al. Effectiveness of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. *J Clean Prod* 2017;148:616e23.
- Hernandez A, Kholif AE, Lugo-Coyote R, Elghandour MMY, Cipriano M, Rodríguez GB, et al. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J Clean Prod* 2017;142:2384e92.
- Hernandez, A., Kholif, A.E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Rodríguez, G.B., et al., 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J. Clean. Prod.* 142, 2384e2392.
- Hollmann, M., Powers, W.J., Fogiel, A.C., Liesman, J.S., Bello, N.M., Beede, D.K., 2012. Enteric methane emissions and lactational performance of Holstein cows fed different concentrations of coconut oil. *J. Dairy Sci.* 95, 2602e2615.
- Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HP, Adesogan AT, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: a review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci* 2013;91: 5045e69.
- Hyypya S., Saastamoinen M., Reeta Poso A. 1999. Effect of a post exercise fat-supplemented diet on muscle glycogen repletion. *Equine vet. J. Suppl.* 30 (1999) 493-498.
- INEGI. Censo Agropecuario. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal Mex.:Ags. INIA Biblioteca Digital; 2009. p. 150.
- Ingale, S.L., Lokhande, A., Zadbuke, S., 2013. Nutritional strategies to mitigate greenhouse gases emission from livestock agriculture: a review. *Int. J. Livest. Res.* 1, 34e45.
- Johnson DE, Ward GM. Estimates of animal methane emissions. *Environ Monit Assess* 1996;42:133e41.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483e2492.
- Jouany J.P., Gober J., Medina B., Bertin G., Julliand V., Effect of live yeast culture supplementatation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high fiber or high starch diet. *J Anim Sci* 2008; 86: 339-47.
- Julliand V., De Fombelle A., Varloud M., 2006. Starch digestión in horses: The impact of feed processing. *Livestock Science* 100, 44-52.
- Karr-Lilienthal LK., Kadzere CT., Grieshop CM., et al., 2005. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review. *Livestock Production Science* 97, 1-12.
- Kataria, R.P., 2015. Use of feed additives for reducing greenhouse gas emissions from dairy farms. *Microbiol. Res.* 6, 6120.
- Kellems, R.O., Church, D.C., 2010. *Livestock feeds and feeding* sixth ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Keweloh H, Heipieper HJ. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* 1996;31:129e37.
- Kronfeld, D.S., and Harris P., 1997. Feeding yhe Athletic Horse. Pages 61-77 in the *Veterinarians Practical Reference to Equine Nutrition*. K.N. Thompon, ed. Purina Mills Inc. AAEO, St. Louis MO.
- Lattimer, J.M., Cooper, S.R., Freeman, D.W., Lalman, D.L., 2007. Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. *J. Anim. Sci.* 85, 2484e2491.
- Lindberg JE., Essén-Gustavsson B., Dahlbornk., et al. 2006. Exercise response metabolisim at rest and digestibility in athletic horses fed high fat oats. *Equine Veterinary Journal, Supplement* 36, 626-630.
- Linder A., Gansen S., 1995. Feeding of trotting racehorses in Germany: a survey among applicants for a trainer´s license. *Veterinary Clinical Nutrition* 2, 29-35.
- Marounek M, Skrivanova V, Savka O. Effect of caprylic, capric and oleic acid on growth of rumen and rat caecal bacteria. *J Anim Feed Sci* 2002;11:507e16.

- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351e365.
- McAllister TA, Okine EK, Mathison GW, Cheng KJ. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canad J Anim Sci* 1996;76:231e43.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82, 3346e3356.
- Medina M., Giraldo D.I., Jacotot E. and Julliard V. 2002. Effect of a preparation of *Sacharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J Anim Sci* 80:2600-2609.
- Moeletsi ME, Tongwane MI, Tsubo M. Enteric methane emissions estimate for livestock in South Africa for 1990 to 2014. *Atmosphere* 2017;8:69.
- Mohammadabadi T, Shakarami MH, Elghandour MMY, Salem AZM, Monroy JC. Effect of Natuzyme enzyme on fecal digestion and fermentation of wheat straw and alfalfa hay in Arabian horses. *J Equine Vet Sci* 2018;70:13e7.
- Morgan LM, Covardale JA, Froetschel MA, Yoon I., Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses. *J. Equine Vet. Sci.* 2007; 27:260-5
- Mwenya, B., Santoso, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Arai, I., et al., 2004. Effects of including 1,4-galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 313e326.
- Nagaraja TG, Newbold CJ, Van Nevel CJ, Demeyer DI. Manipulation of rumen fermentation. Dordrecht: Springer; 1997.
- Nehra R., Purohit G.R., Sharma T., et al., 2005. Common Feeding stuffs of horses in arid zone – a survey. *Veterinary Practitioner* 6, 157-158.
- Nevel CJ, Demeyer DI. Control of rumen methanogenesis. *Envt Monit Assess* 1996;42:73e97.
- NRC, 2007. In: The nutriment requirements of horses, 6th revised edition National Academy press, Washington DC.
- NRC. Nutrient requirements of horses. 6th ed. Washington, DC: National Academy Press; 2007.
- O'Connor CI, Lawrence LM, Lawrence AC, Janicki KM, Warren LK, Hayes S. The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J Anim Sci* 2004;82:2978e84.
- Pagan, J.D., 1998. *Advances in Equine Nutrition*, 1st ed., Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK.
- Parra-Garcia A, Salem AZM, Elghandour MMY, Camacho LM, Odongo NE. Potential impact of prickly pear cactus flour and *Salix babylonica* extract on cecal fermentation and methane production in horses. *Agroforest Syst* 2018;92:1145e54.
- Patra, A.K., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 366e375.
- Pedraza-Hernandez, J., Elghandour, M.M.Y., Khusro, A., Camacho-Diaz, L.M., Vallejo, L.H., Barbabosa-Pliego, A., et al., 2019. Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleifera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment. *J. Clean. Prod.* 234, 779e786.
- Petterson D., Aman P., 1987. The variation in chemical composition of triticales grown in Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica* 37: 20-26.
- Pilliner, S., 1993. *Horse Nutrition and feeding*, 1st ed., Blackwell Scientific publications, Osney Mead, Oxford.
- Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36e45.
- Potter G.D., Arnold F.F., Householder D.D., Hansen D.H. and Brown K.M. 1992. Digestion of starch in the small and large intestine of the equine. Pp 107-111. Hanover-Germany.
- Ragnarsson, S., Lindberg, J.E., 2008. Nutritional value of Timothy grass haylage in Icelandic horses. *Livestock Science* 113, 202-208.
- Ramírez D.M., 2008. Comunicación personal. Gerente de producción. Biotecap SA de CV.

- Richards, N., Hinch, G.N., Rowe, J.B., 2006. The effect of current grain feeding practices on hindgut starch fermentation and acidosis in Australian racing Thoroughbred. *Australian Veterinary Journal* 84, 402-407.
- Rossister, M., 2008. The effect of fat supplementation on digestion parameters in the horse (M. Sc. Thesis). Oklahoma State University, Oklahoma, USA.
- Salem AZM, Elghandour MMY, Kholif AE, Barbabosa A, Camacho LM, Odongo NE. The effect of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count and in vitro fecal fermentation. *J Equine Vet Sci* 2015;39:12e9.
- SAS, 2002. User's Guide: Statistics. SAS Institute, Cary, NC, version 9.0.
- Suavant D., Perez J.M., Tran G., 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185e197.
- Vallejo L, Salem AZM, Kholif A, Elghandour M, Fajardo R, Rivero N, Bastida A, Mariezcurrena M. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. *Indian J Anim Sci* 2016;86:70e4.
- Van Keulen J., Young BA. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J Anim Sci* 1977;44:282-7.
- Van Soest PJ, Roberson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991; 74:3583-97.
- Varlout, M. Fonty, G., Roussel, A., Guyonuar, A., Julliand, V., 2007. Postprandial Kinetics of some biotic and abiotic characteristics of the gastric ecosystem of horses fed a pelleted concentrate meal. *J. Anim. Sci.* 85, 2508-2516.
- Velazquez AE, KholifAE, Elghandour MMY, Salem AZM, de Oca Jimenez R, Pliego AB, et al. Effect of partial replacement of steam rolled corn with soybean hulls or prickly pear cactus in the horse's diet in the presence of live *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro fecal gas production. *J Equine Vet Sci* 2016;42:94e101.
- Wanapat, M., Kang, S., Polyorach, S., 2013. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 32.
- Wang M, Jing Y, Liu S, Gao J, Shi L, Vercoe P. Soybean oil suppresses ruminal methane production and reduces content of coenzyme F420 in vitro fermentation. *Anim Prod Sci* 2016;56:627e33.
- Weese JS. Microbial evaluation of commercial probiotics. *J AM Vet Med Assoc* 2002;220:794e7.
- Winders TM, Boyd BM, Hilscher FH, Stowell RR, Fernando SC, Erickson GE. Evaluation of the effect of corn oil on methane production in finishing cattle. *J Anim Sci* 2018;96:231e2.
- Wolever TMS, Jenkins DJA, Jenkins AL, Josse RG. The Glycemic index: methodology and clinical implications. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 846-854.