



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO.



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

PRODUCCIÓN DE GASES FECALES DE
CABALLOS *In vitro*, CON DIETAS DE DIFERENTES
INCLUSIONES DE ENSILADO DE PESCADO SAPO,
INOCULADOS CON. *Staphylococcus saprophyticus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTA:

CENORINO BARRERA VICARIO

DIRECTOR DE TESIS:

MC. EDSON BRODELI FIGUEROA PACHECO

Resumen

El presente contexto se diseñó para investigar el efecto del ensilado de pescado diablo (*Plecostomus* sp.) y *Staphylococcus saprophyticus* en las características de fermentación así como en los atributos de mitigación de la producción de gases de efecto invernadero en caballos. Cuatro niveles de ensilado de pescado diablo (DF) a 0 (control-DF0), 6 (DF6), 12 (DF12) y 18% (DF18) se agregaron a la dieta. Además, se utilizaron tres dosis de *S. saprophyticus* (0, 1 y 3 ml / g de MS) para la fermentación fecal in vitro. El uso del ensilado de pescado diablo dio como resultado un aumento del pH ($P < 0,0001$) durante la fermentación. La producción asintótica de gas fue la más alta ($P < 0,0001$) en el DF6, mientras que otras suplementaciones causaron una producción más baja que la del control. El tiempo de espera para la producción de gas asintótico disminuyó ($P < 0.05$) con el aumento de las dosis de ensilado de pescado diablo en la dieta. La inclusión de *S. saprophyticus* dio como resultado la producción de gas más baja ($P < 0.05$) y ml / 0.5 g de MS incubados, y por lo tanto, redujo la producción de gas hasta 23.17% que la del control. La interacción del pez diablo \times *S. saprophyticus* mostró la producción de gas más baja en DF18 mientras que la producción más alta se estimó en DF6 sin *S. saprophyticus* después de 48 h. La menor emisión de CO_2 ($P < 0,0001$) se observó en la inclusión de DF18, que fue un 15,25% inferior a la del control a las 48 h de fermentación. En contraste, la producción más baja de hidrógeno (H_2) se estimó en DF0, mientras que DF18 exhibió la más alta. La inclusión de DF12 y DF18 redujo ($P < 0.09$) la emisión de metano (CH_4) en un 58.24 y 59.33%, respectivamente. Sin embargo, la interacción de peces diablo, *S. saprophyticus* y peces diablo \times *S. Saprophyticus* no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la producción de CH_4 . En conclusión, los peces diablo ensilados y *S. saprophyticus* podrían complementarse en la dieta equina como alternativas prometedoras al maíz para mitigar la emisión de gases de efecto invernadero de manera efectiva.

Palabras clave: peces diablo, *Staphylococcus saprophyticus*, Equinos, gases de efecto invernadero.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIA	
RESUMEN	
CONTENIDO.....	VII y VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
I.- INTRODUCCIÓN.....	11-13
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2-1.-El Pez Sapo.....	14
2.2.-Reproducción.....	15
2.3.-Ciclo de vida.....	16
2.4.- Distribución.....	16
3.5.- Ensilado.....	16
2-6.- Yogurt Natural.....	17
2.7.-Melaza.....	17
2.7.1.- Composición de la melaza.....	18
2.8.-Sistema digestivo del caballo.....	18
2.8.1.- La boca.....	19
2.8.2.- El esófago.....	20
2.8.3.- El estómago.....	20
2.8.4.- El intestino delgado.....	21
2.8.5.- El intestino grueso.....	21
2.9.- Producción de gas <i>In vitro</i>	22
2.9.1.- Origen del gas.....	23
2.10.- Desarrollo histórico de la técnica de producción de gas.....	23
2.10.1.- Medición del volumen de gas.....	24

2.10.2.- Medición de la presión de gas.....	24
2.11.- La importancia a de los pastos con respecto al ensilado para la alimentación de caballos.....	25
2.12.- Métodos de conservación de forrajes.....	25
III.- OBJETIVO GENERAL	26
3.1.- Objetivos específicos.....	26
3.2.- Hipótesis.....	26
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1.- Ubicación del área del trabajo.....	27
4.2.- Materiales.....	27
4.3.- Material de laboratorio.....	28
4.4.- Limpieza de frascos.....	30
4.5.- Cálculos de cada uno de los reactivos.....	31
4.6.- Extracción de heces fecales de caballos.....	31
4.7.- Incubación.....	32
4.8.- Sustrato y tratamientos.....	36
4.9.- Incubación <i>in vitro</i>	36
4.10.- Cálculos y análisis estadísticos.....	38
V.- RESULTADOS.....	39
5.1.- Cinética de gas <i>In vitro</i>	39
5.2.- Parámetros de fermentación fecal.....	43
5.3.- Producción fecal de gases de efecto invernadero.....	45
VI.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	50-54
VII.- CONCLUSIONES.....	55
VIII.- REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro. 1.- Dieta integral testigo.....	28
Cuadro. 2.- Dieta integral tratamiento 6% de inclusión.....	29
Cuadro. 3.- Dieta integral tratamiento 12% de inclusión.....	29
Cuadro. 4.- Dieta integral tratamiento 18% de inclusión.....	30
Cuadro 5 Ingredientes y composición química de las dietas con diferentes niveles de ensilado de pescado diablo utilizados como sustrato1.....	37
Cuadro 6: Efecto de <i>S. saprophyticus</i> (SS) como aditivos alimentarios sobre el gas total fecal <i>in vitro</i> , CH ₄ , CO ₂ y H ₂ cinetica1 de las dietas a diferentes inclusiones de ensilados de pescado diablo (DF).....	44
Cuadro 7: Efecto de <i>S. saprophyticus</i> (SS) como aditivos alimentarios sobre parámetros de fermentación fecal <i>in vitro</i> , así como producción de gas total en diferentes períodos de incubación, usando diferentes inclusiones de ensilados de pescado (DF).....	46
Cuadro 8: Efecto de <i>S. saprophyticus</i> (SS) como aditivos alimentarios en la producción de CH ₄ fecal <i>in vitro</i> en diferentes periodos de incubación utilizando diferentes inclusiones de ensilados de pescado diablo (DF).....	47
Cuadro 9: Efecto de <i>S. saprophyticus</i> (SS) como aditivos alimentarios en la producción de CO ₂ fecal <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación usando diferentes inclusiones de ensilados de pescado diablo (DF).....	48
Cuadro 10: Efecto de <i>S. saprophyticus</i> (SS) como aditivos alimentarios en la producción de H ₂ fecal <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación utilizando diferentes dosis de ensilados de pescado diablo (DF).....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras

1	Sistema digestivo del caballo.....	19
2	Lavado de frascos.....	30
3	Etiquetado de frascos.....	32
4	Secado de bolsas y frascos.....	32
5	Colocación de dietas en los frascos.....	33
6	Tapado y sellado	33
7	Colocación de frascos.....	34
8	Secado de frascos.....	34
9	Toma de primero lecturas.....	35
10	Secado de bolsas al aire libre	35
11	Producción total de gas fecal de caballo.....	39-43

I. INTRODUCCIÓN

Los caballos son herbívoros no rumiantes, monogástricos y que fermentan el intestino trasero, donde el ciego y el colon son las cámaras fermentativas para microbiota dispar. La población microbiana presente en el intestino delgado es conocida por la estimulación de la inmunidad, la exclusión de patógenos y la desintoxicación de componentes peligrosos (Shepherd ML, et al. 2012). La dieta de los caballos está enriquecida con fibras; sin embargo, la microbiota de intestino delgado permite digerir dietas basadas en fibra gradualmente debido al hecho de que la fibra no es digerible por las enzimas secretadas. Sin embargo, la alteración en las prácticas de alimentación y las actividades de los caballos de hoy en día han llevado a un mayor nivel de grano / almidón y niveles más bajos de fibra en su dieta (Fombelle A, et al. 2003 y Sadet-Bourgeteau S. et al. 2010). Esto se hace con el fin de proporcionar una liberación rápida de energía para satisfacer la necesidad de energía de la actividad de alto ritmo del equino. Sin embargo, tales prácticas de alimentación conducen a las causas principales de varios trastornos, a saber. Ulceración gástrica, acidosis del intestino delgado y endotoxemia (Rowe JB, et al. 1994). Además, la alimentación de estas dietas puede disminuir el rasgo de la digestión del almidón en el intestino delgado y alterar la población microbiana, así como las características fibrolíticas en el intestino delgado, reduciendo así la capacidad de utilizar la energía de las dietas, como resultado de la alteración del pH del intestino delgado (Cipriano-Salazar M et al., 2019 y Mungall BA et al. 2001). Sin embargo, el subproducto rico en pectina (limón, mandarina y piña), el subproducto de origen agrícola (pulpa de remolacha azucarera y cáscara de soja) se han propuesto para proporcionar energía a los caballos sin causar alteraciones digestivas / offset (Cipriano-Salazar M et al. 2019). Sin embargo, existe la urgencia de explorar otros recursos para satisfacer las demandas de energía, la salud intestinal y mejorar el rendimiento atlético de alto nivel de los caballos modernos. Actualmente, la suplementación de aditivos diversificados en los alimentos se considera una estrategia propicia para mejorar la utilización de la energía en los

caballos. Desafortunadamente, la emisión perpetua de gases de efecto invernadero (GEI), en particular el metano (CH₄) y el dióxido de carbono (CO₂) de los animales debido a la fermentación son la carga colosal a nivel mundial. Estos PSI se consideran no solo contaminantes ambientales sino también peligrosos para la salud humana, lo que resulta en el calentamiento global (Elghandour MMY et al. 2017). La búsqueda de recursos naturales alternativos propicios para mitigar la emisión de PSI para una sociedad más limpia y un entorno sostenible ha ganado un gran interés. Por ejemplo, se han utilizado distintos aditivos para piensos naturales como el extracto de plantas (Cedillo J et al. 2015), la enzima (Vallejo LH et al. 2016), las levaduras (Elghandour MMY et al. 2017). Y los lactobacilos (Elghandour MMY, Khusro A et al, 2018). Sin embargo, la explotación de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SNC) como aditivo alimenticio en la nutrición de los caballos para mitigar la emisión de GEI no está todavía evidenciada. *Staphylococcus equorum*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. condimentii*, *S. succinus* y *S. xylosus* pertenecen al grupo de *Staphylococcus coagulasa* negativos (Khusro A et al. 2019). En los últimos tiempos, del *Staphylococcus coagulasa* negativos se ha convertido en el grupo heterogéneo predominante de bacterias, e incluido bajo el estado de Presunción Calificada de Seguridad por el Comité Científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en una base de caso por caso dentro de un grupo taxonómico particular (EFSA 2005).

En los últimos años, el *Staphylococcus coagulasa* negativos ha surgido como un grupo diferente de bacterias asociadas a los alimentos fermentados que revelan propiedades probióticas (Khusro A, y Aarti C et al., 2018). Además, se notificó que el SNC era el tipo de bacteria predominante en algunos alimentos coreanos fermentados (Guan L et al. 2014). Esto es una indicación de las propiedades de fermentación del *Staphylococcus coagulasa* negativos o de sus propiedades probióticas. Además, del pescado diablo (*Plecostomus* sp.) están incluidos en la dieta animal debido a su abundancia y máxima digestibilidad (Avdalov N et al. 1989). Además, el ensilaje del pescado podría allanar un camino para mejorar su uso como ingrediente alimentario. La enzima proteolítica del ensilado de pescado podría mejorar la digestibilidad del alimento. Además, es un hecho bien establecido que

los alimentos fermentados se enriquecen con microbios probióticos beneficiosos para la salud (Borah D et al. 2016). El efecto del pescado diablo se ha estudiado en la dieta rumiante (Tejeda-Arroyo E et. al. 2015) con una mejor respuesta en la cinética de fermentación. Sin embargo, este tipo de investigación está inexplorada en equinos.

Teniendo esto en cuenta, se emprendió un nuevo intento significativo en este contexto para llenar la laguna de la investigación mediante la determinación de la cinética de fermentación y los atributos de mitigación de la producción de GEI de *S. saprophyticus* y el ensilado de pescado diablo en caballos como a los suplementos alimenticios para un limpiador y eco-producto amigable.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.-El Pez Sapo

Clasificación científica

Familia: *Antennariidae*

Orden: *Lophiiformes*

Nombre común: Pez sapo o ranisapo

Nombre científico: *Antennariidae*

El pez sapo, llamado de esta manera debido a su parecido con los anfibios comunes cuando se encuentra en posición de tendido, posee un tamaño que varía desde los 5 cm hasta algunos ejemplares colosales de 40 cm. Además, su parecido con las ranas también puede evidenciarse en la morfología de sus aletas, similares a una extremidad, y que utilizan para desplazarse lentamente sobre el lecho marino y la superficie de algunas esponjas y corales, desde donde acechan a sus presas. En cuanto a su color, esta característica tampoco permite identificar a los peces sapo, ya que algunos ejemplares poseen varios colores, muy diferentes entre ellos, y que le permiten camuflarse con su entorno. Dependiendo de la especie, el cambio de coloración puede tomar desde unos escasos segundos hasta toda una semana. La piel de algunos peces sapo también puede encontrarse adornada de pequeñas protuberancias, solapas, pelos y borlas que contribuyen aún más al proceso de camuflaje, llegando de esta manera a imitar cualquier entorno cercano, así como corales, esponjas y malezas. Por esta razón, muchos buzos y fotógrafos submarinistas podrán pasar sobre un pez sapo sin apenas advertir su presencia. (Antonio M, 2014).

Por otra parte, y aunque no existen muchos otros peces que se puedan confundir con el pez sapo, puede ser excepcionalmente difícil distinguir entre el sexo o la especie a la que pertenecen estos animales. Dado que la coloración es un aspecto poco útil a la hora de identificar estas especies, muchos especialistas se basan en algunas características particulares como sus tácticas de camuflaje (si imita a un gusano o a un pez), el número de ojos y el número de espinas. (Everardo Barba, 2018).

En el plano de la alimentación, es donde el pez sapo arroja mayores curiosidades. Perfectamente camuflado, esperará la aparición de su presa, y en ese momento, el señuelo desplegado le permitirá atraer a su víctima de maneras muy diversas, dependiendo de la especie. Además, también emplean un atrayente químico, de modo que en algunas ocasiones, es cuestión de sentarse a esperar la presa, y atacar cuando esta se encuentra suficientemente cerca. Principalmente, un pez sapo de alimentará no solo de pequeños peces, sino también de camarones y cangrejos, y en algunas ocasiones, las presas podrán presentar el doble de su tamaño. Siendo una especie desdentada, el pez sapo tragará a sus presas de manera íntegra para digerirla luego por medio de sus jugos digestivos. Algunos observadores han podido constatar cómo las víctimas de este pez se mueven y retuercen en las paredes de su estómago en plena agonía de muerte. (Antonio M. 2014).

2.2.- Reproducción

No se conoce mucho sobre los hábitos reproductivos del pez rana, y en realidad, se trata de un espectáculo bastante raro de ver en la naturaleza. Durante el proceso, la hembra quedará tan repleta de huevos (más de 180 000), que su cuerpo se volverá enormemente distendido y abultado. Por su parte, el macho empujará el abdomen de la hembra con la intención de salir a la superficie, donde tomará lugar el desove (Toledo Ocampo, A. 2005)

2.3.- Ciclo de vida

Al igual que con el tema reproductivo, existen muy pocos estudios empíricos sobre el ciclo de vida de los peces sapo. La mayoría de los datos disponibles sobre los animales marinos proviene de la pesca, un escenario donde los peces sapo no son tan comunes. Resulta difícil imaginar que estos animales viven más allá de unos pocos años. Ciertamente, su esperanza de vida en cautiverio es relativamente corta, y en la naturaleza, donde experimentan otros riesgos como los parásitos y la disponibilidad de alimentos, esta cifra de tiempo es poco probable que sea mayor (Antonio M, 2014).

2.4.- Distribución

Los peces sapo se encuentran en las aguas tropicales y subtropicales de nuestro planeta. La mayoría de las ejemplares viven en aguas relativamente poco profundas, aunque una parte de ellos gustan de habitar entornos mucho más profundos. En algunas zonas de Asia donde se practica el buceo recreativo, es común que los turistas encuentren especies de peces sapo, así como peces gigantes y peces payasos. (Alberto Nájar, 2011)

2.5. Ensilado.

El ensilaje de vísceras de pescado se ha venido utilizando como alternativa para conservar los subproductos del pescado, los cuales tienen uso potencial como fuente de proteína en dietas para rumiantes. (Julio E Bermudez 1999).

Los ensilados pueden ser biológicos y químicos. Los primeros, son aquellos que, a la molienda del pescado, se le adicionan hidratos de carbono (ej. melaza) y microorganismos (*Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus*, *Candida lipolítica*, etc.).

En el caso de los químicos, se utilizan diferentes ácidos, tales como: ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico o mezclas de acético, fórmico y fosfórico, fórmico y sulfúrico o propiónico y sulfúrico (Julio E Bermudez, 1999). El resultado final en ambos casos es un descenso del pH.

Este proceso consiste en estabilizar desechos de pescado y/o pescados enteros de bajo valor comercial, mediante la adición de ácidos orgánicos, inorgánicos, sal, mezclas de ellos o fermentación bacteriana por medio de una fuente de carbohidratos. La presencia de ácidos orgánicos o minerales aumenta la fermentación láctica y desciende del pH, el cual inhibe el crecimiento de bacterias, permitiendo el almacenamiento del ensilado por tiempos prolongados (Wakida Kusunoki, 2011)

Para el ensilado pueden utilizarse diferentes tipos de carbohidratos, tales como mieles de caña, subproductos de cereales y yuca; además es posible utilizar Lactobacillus, estreptococcus y otros microorganismos (Oscar, Miranda. 2010).

2.6.- Yogurt Natural

El yogurt es fuente de proteínas y grasas lácteas, aunque debido al proceso de fermentación bacteriano, la lactosa también se fermenta, lo que significa que las personas intolerantes a la lactosa sí pueden consumir yogur. Además, es rico en calcio y en algunas vitaminas del grupo B. También es beneficioso para el sistema inmunitario, porque ayuda a combatir las infecciones y disminuye los efectos negativos de los antibióticos. Además, estabiliza la flora intestinal y el conjunto de microorganismos del sistema digestivo (Parra Huertas, Ricardo Adolfo. 2012)

2.7.- Melaza

La melaza de caña es una alternativa muy buena para endulzar los alimentos, ya que tiene un alto contenido en minerales y es mucho mejor que los edulcorantes blancos como el azúcar que han sido tratados, y les han eliminado todas

las propiedades beneficiosas. También es conocida como miel de caña, Es una buena alternativa para sustituir el azúcar refinado. Tiene un color oscuro, porque contiene una gran cantidad de azúcar de caña. La melaza orgánica tiene muchas propiedades beneficiosas para el organismo. Una cucharada al día de melaza orgánica contiene la cantidad recomendada diariamente de calcio, magnesio, y hierro. (Huertas, Ricardo Adolfo. 2012)

2.7.1.- Composición de la melaza

Contiene gran cantidad de hidratos de carbono que ayuda a aumentar los niveles energéticos del organismo. Esto ocurre porque los hidratos de carbono aumentan las reservas de hierro del organismo.(Zech M. y Gorisch, H: 1995)

2.8. Sistema digestivo del caballo.

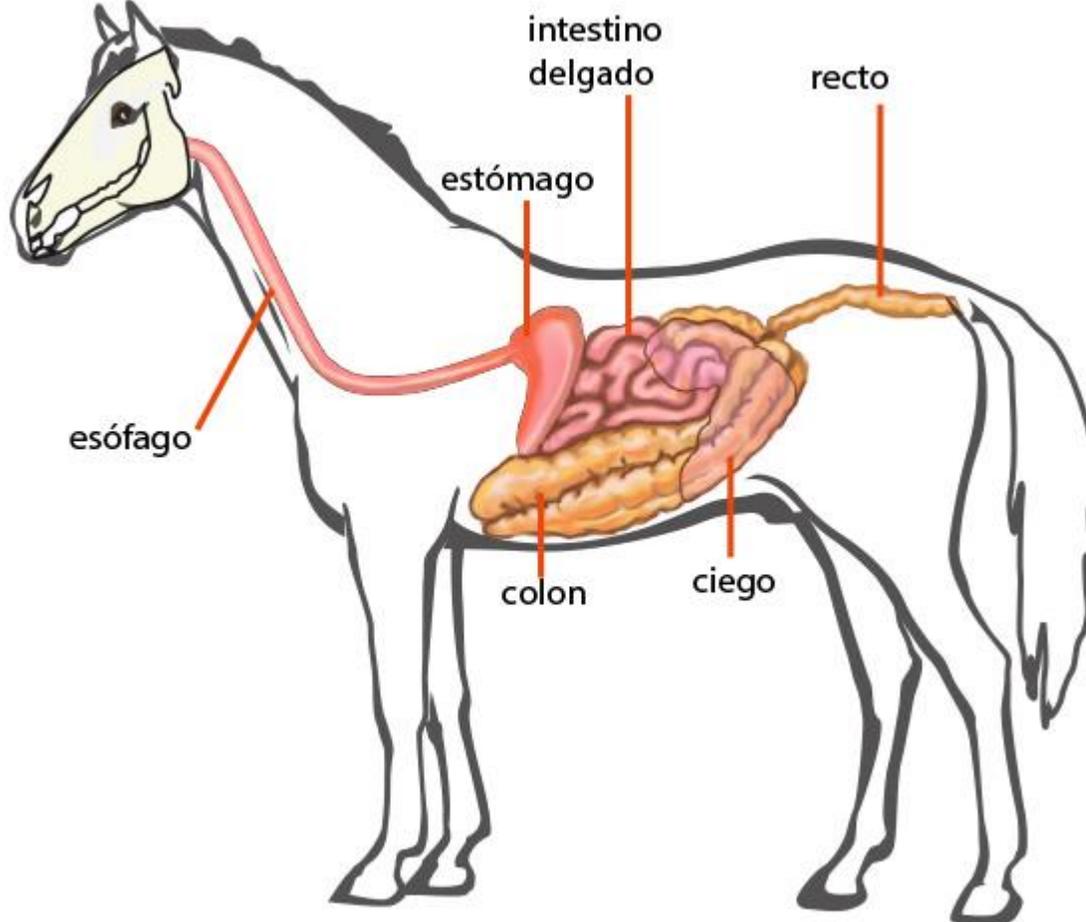
El sistema digestivo equino se divide en dos grandes partes:

La parte delantera: compuesta por la boca, esófago, estómago e intestino delgado. Esa parte es muy similar a cualquier animal monogástrico (con un solo estómago), como el cerdo, el perro o nosotros mismos. La parte trasera: que comprende el intestino grueso, compuesto por ciego, colon y recto.

Esta parte del sistema digestivo del caballo es más parecida a los rumiantes o poligástricos como la vaca y la oveja.

Cada uno de estos componentes del sistema digestivo tiene peculiaridades relacionadas con el manejo de la alimentación. (Kevin González. 2018)

Figura 1.- Sistema digestivo del caballo



2.8.1. La boca

Su principal misión es la de aprehender, coger el alimento, romperlo, masticarlo y mezclarlo con la saliva producida solo por el hecho de la masticación (no por oler o

ver el alimento como nos pasa a los humanos cuando tenemos hambre). (Kevin González. 2018)

La producción de saliva es muy importante para que el alimento se lubrifique correctamente y sea tragado sin dificultad ni atragantamientos. Un caballo puede producir de 5 a 10 litros diarios de saliva. Está demostrado que los pellets de mayor tamaño provocan una mayor masticación y, por tanto, insalivación, algo que tenemos muy en cuenta en los piensos Covaza Nutrición Equina. También los mix, por componerse de partículas de distintos tamaños y formas, favorecen la masticación del caballo. (Daniel R. Cortés. 2011.)

2.8.2. El esófago

El esófago se extiende desde el paladar hasta el estómago. Termina en una válvula muy poderosa que se llama cardias que sólo se abre en dirección hacia el estómago y no al contrario. Esta particularidad hace que los caballos no puedan eructar, ni vomitar, por lo que están predispuestos a una distensión gástrica y cólico. Esto debe hacernos tener un especial cuidado con el tipo y estado de conservación de los alimentos que proporcionamos a nuestros caballos. (Benjamín A. Solís. 20014.)

2.8.3. El estómago

Se divide básicamente en dos secciones, la glandular y la no glandular. Con una capacidad aproximada de 15 litros (el 10% del total del sistema digestivo), el estómago del caballo tiene, además, un ambiente ácido, pues su pH oscila entre 1.5 y 2. En él se absorbe una pequeña parte de la proteína, y el alimento tarda en pasar por él entre 20 y 30 minutos. (Marlin, D. y Nankervis, K. 2002):

2.8.4. El intestino delgado

Dividido en duodeno, yeyuno e íleon, tiene una longitud de unos 21-25 metros (del total del sistema digestivo, representa el 75%, y de su volumen, un 30% del total).

También tiene un ambiente ácido, aunque menor: el pH oscila entre 2.5 a 3.5.

En el intestino delgado del caballo se absorben casi todos los nutrientes: proteína, grasas, hidratos de carbono y, en el íleon, los minerales.

El alimento tarda en pasar de 4 a 5 minutos hasta 2 horas. Además de ayudar a la insalivación, una mayor masticación del alimento por parte del caballo reduce el tamaño final de las partículas que lo componen, lo que facilitará a las enzimas del intestino delgado extraer al máximo los nutrientes. (Daniel R. Cortés. 2011.)

2.8.5. El intestino grueso

Dividido en ciego, colon y recto, tiene una longitud de unos 7 metros, aunque su volumen es el mayor de todo el tracto gastrointestinal: unos 150 litros (el 60% de todo el sistema digestivo). Aquí el pH ya es casi neutro, entre el 6 y el 7 (normalmente de 6,7). El intestino grueso del caballo es la auténtica cámara de fermentación de los forrajes donde cerca de 400 especies distintas de microorganismos absorben la fibra que contienen en forma de ácidos grasos volátiles (acetato, butirato y propionato). El paso o flujo del alimento es muy lento, puede tardar 22 h o incluso 2 días. (Canelón, J.L., J. Páez y C. Rojas. 2002).

Esta “cámara” tiene la peculiaridad de requerir un funcionamiento continuo; es decir un aporte de forraje continuo de pequeñas cantidades. El tiempo en que tarda en pasar el alimento por el sistema digestivo, dependerá de la cantidad de comida que se suministre en cada toma: a mayor cantidad, menor tiempo de paso. También

dependerá de la forma física del alimento (por ejemplo los forrajes tardan más en pasar que los concentrados, bien sean pellets o granos de cereales).

El forraje es, por tanto, fundamental. Estudios procedentes de otras especies animales demuestran que una ralentización del paso de la ingesta por el tubo digestivo hace que se aprovechen en mayor medida los nutrientes. (Canelón, J. L. 2005)

Mantener un intestino grueso sano, implica, directamente, mantener un caballo saludable y con un nivel de rendimiento (si hablamos de deporte) muy superior.

No nos cansaremos de recordar que el sistema digestivo del caballo está diseñado para proveerle de alimento bajo la regla de “muchos pocos”. Baste citar un peligro asociado a la falta de forraje: el caballo, al contrario que nosotros, no dispone de vesícula biliar, y la segregación de la bilis es constante independientemente de que el aparato digestivo reciba o no alimento sobre el cual pueda actuar. (De Armas, R. 1946).

2.9. Producción de gas *in vitro*

El estudio de la producción de gas *in vitro* proporciona información de la cinética de fermentación y de la degradación del alimento en el rumen, lo cual permite estimar el contenido energético y pronosticar el aprovechamiento del alimento. El volumen de gas que produce *in vitro* un determinado sustrato, se utiliza como un índice de la fermentación microbiana de los alimentos. La evolución de la producción de gas permite una estimación más aproximada de la cinética de la fermentación microbiana del alimento en el rumen (Fondevila y Barrios, 2012).

2.9.1- Origen del gas

La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, formato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), y trazas de hidrógeno (H₂); sin embargo, ellos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (S L Posada y R Noguera. 2005).

La producción de gas desde la fermentación de la proteína es relativamente pequeña y la derivada desde la grasa es insignificante (Makkar, et al, 1995).

El gas es producido principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato. La fermentación del sustrato hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del ácido; por consiguiente, una menor producción de gas es asociada con la fermentación propiónica. En conclusión, la técnica de producción de gas mide la cantidad de gas liberado directamente como un producto de la fermentación e indirectamente desde el fluido ruminal neutralizado.

2.10.- Desarrollo histórico de la técnica de producción de gas

Tres aproximaciones para medir la producción de gas han sido usadas:

- 1) medir el volumen de gas a presión atmosférica constante.
- 2) medir la presión de gas a un volumen fijo.

3) medir el número de incrementos de volumen requeridos para causar un pequeño cambio definido en la presión, una combinación de los métodos 1 y 2.

La elección del método para medir la producción de gas depende del supuesto que los excesos de presión acumulada afectan el crecimiento microbiano (Schofield y Pell 1995) y generan cambios en la solubilidad de los gases en el medio, lo cual puede generar errores en las mediciones (Getachew G et al., 2015).

2.10. 1. Medición del volumen de gas

Como ejemplos de la primera aproximación está el método manométrico; (Beuvink et al., 1992) y el método desarrollado en la Universidad de Höhenheim en Alemania (Menke et al., 1979; Menke y Steingass, 1988). En el primero se mide la cantidad de agua desplazada debido a la acumulación de gas y, en el segundo se involucra el uso de jeringas de vidrio, en las que el embolo se desplaza en la medida en que la presión de gas incrementa.

2.10.2.- Medición de la presión de gas

La cinética de producción de gas puede medirse de una forma más precisa empleando transductores de presión y variantes del sistema han sido descritos por Pell y Schofield (1993), Theodorou et al (1994), Davies et al (1995)

2.11.- La importancia a de los pastos con respecto al ensilado para la alimentación de caballos.

Los forrajes representan la más abundante y económica fuente de nutrición para los rumiantes en los trópicos, la producción de algunos pastos ya es más fácil su manejo y sirve como reserva de alimento en cuestiones de la conservación, para la época de sequía en climas de lluvia anual. (Cipriano-Salazar M. 2019)

2.12.- Métodos de conservación de forrajes

- ✓ La henificación

El ensilado como método de conservación de excedentes

- ✓ Proceso fermentativo y diferentes formas de ensilado
- ✓ Elección del momento de corte
- ✓ Ensilabilidad del forraje
- ✓ Pérdidas durante el proceso de ensilado
- ✓ Aditivos para ensilar
- ✓ Calidad nutritiva y fermentativa del ensilado
- ✓ Consideraciones sobre el ensilado de subproductos

III.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de gases *In vitro* del ensilado de pez sapo.

3.1.- Objetivos específicos

Medir la cinética de digestibilidad y degradabilidad, en los diferentes niveles de inclusiones del ensilado de pez sapo, incubados con inóculos fecales de caballos durante varias horas.

3.2.- Hipótesis

Durante el proceso *In vitro*, habrá una interacción positiva en la producción de gases, en los primeros 15 horas a partir de la incubación, ya que las dietas contienen ingredientes sólidos digestibles.

La hora en que ocurre la degradación y digestibilidad *In vitro* del ensilado de pez sapo, en las diferentes dietas con inóculos fecales de caballos, es de 5 horas en las 3 niveles de inclusión (6, 12 y 18%).

IV.- LOS MATERIALES Y LOS MÉTODOS

4.1. Ubicación del área de estudio .

El siguiente trabajo para la elaboración del ensilado de pescado sapo se realizó en la Universidad Autónoma de Guerrero en la ciudad de Iguala Guerrero y también el en laboratorio de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) es una institución pública estatal de educación superior con sede principal en la ciudad de Toluca, México. Se utilizó ensilado de pez sapo

4.2.- Materiales

- ❖ Ingredientes para la elaboración del ensilado.
 - 14L Melaza
 - 1LYogurt
 - 5kg Pez sapo
- ❖ Utensilios que se utilizó para la mezcla de los ingredientes del ensilado.
 - 1 cubeta de 20L
 - 1 cubeta de 10L
 - 1 Bandeja
 - 3 Costales de Rafia
 - Rafia
 - Tijeras
 - Bascula
 - Lazo
 - Pala

4. 3.- Material de laboratorio

1. Agua destilada
2. Baño maría
3. Pipetas
4. Potenciómetro (EXTECH)
5. Estufa (SRINDER)
6. Molino (WILLEY)
7. Vasos graduados
8. Gasas
9. Guantes
10. Probetas
11. Frascos
12. Bandeja y tina
13. Senador
14. Balanza analítica (PIONEER)

Cuadro. 1.- Dieta integral testigo

INGREDIENTES	Kg	%
Maíz molido	1,34	73,5
Fibra (pastos)	0,27	15
Soya	0,16	9
Ensilado PS	-	0
Sales M.	0,05	2,5
Total	1,82	100

Cuadro. 2.- Dieta integral tratamiento 6% de inclusión

INGREDIENTES	Kg	%
Maíz molido	1,229	67,5
Fibra (pastos)	0,273	15
Soya	0,164	9
Ensilado PS	0,109	6
Sales M.	0,046	2,5
Total	1,820	100

Cuadro. 3.-Dieta integral tratamiento 12% de inclusión

INGREDIENTES	Kg	%
Maíz molido	1,119	61,5
Fibra (pastos)	0,273	15
Soya	0,164	9
Ensilado PS	0,218	12
Sales M.	0,046	2,5
Total	1,820	100

Cuadro. 4.-Dieta integral tratamiento 18% de inclusión

INGREDIENTES	Kg	%
Maíz molido	1,010	55,5
Fibra (pastos)	0,273	15
Soya	0,164	9
Ensilado PS	0,328	18
Sales M.	0,046	2,5
Total	1,820	100

4.4.-Limpieza de frascos

Se lavaron los frascos con bastante agua y jabón,

Figura 2.- Lavado de frascos



4.5.- Cálculos de cada uno de los reactivos

Preparación de soluciones para 5 litros

- Solución micro-minerales
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.2gr
 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10.0gr
 - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0gr
 - $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8.0gr
- Solución buffer
 - $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ 4.0gr
 - Na HCO_3 35.0gr
- Solución macro-minerales
 - $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.45gr
 - $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 6.20gr
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.60gr
- Solución Rezasorina .1gr
- De agua destilada se requiere de 500ml para preparar 900ml

4.6.- Extracción de heces fecales de caballos.

Obtuvimos estas muestras a partir de la extracción de heces fecales de caballos con un tiempo de ayuno, esto se hizo en la madrugada.

4.7.-Incubación

A partir de las heces de caballo que obtuvimos, los frascos limpios y las medidas de los reactivos, de manera ordenada se obtuvo lo siguiente:

- 1) Después de que lavamos los frascos, los etiquetamos con cinta con el fin de que está, soportara los cambios de temperatura y el contante contacto con el agua.

Figura 3.- Etiquetado de frescos



- 2) A partir de que le dimos forma a las bolsas, las pesamos vacías
- 3) Posteriormente dejamos secar en la estufa las 12 horas a una temperatura adecuada.

Figura 4.- Secado de bolsas y frascos



- 4) Vaciamos. 500gr de material de las dietas, dentro del frasco, así sucesivamente de las 4 dietas.

Figura 5.- Colocación de dietas en los frascos.



- 5) Vaciamos el líquido de la heces fecales de 10ml en el frasco

- 6) Se vació 20ml de solución, dentro del frasco.

- 7) Posteriormente se llevó a cabo el tapado y sellado de los frascos, con cinta.

Figura 6.- Tapado y sellado



- 8) Se hizo la colocación de los frascos en la canasta para trabajar en los baños marías.

Figura 7.- Colocación de frascos



- 9) Se preparó el baño maría a 37 °C

- 10) Se colocaron los frascos dentro de las estufas, donde estas se mantienen a 60°C

Figura 8.- Secado de frascos



11) Después de las dos horas transcurridos, se tomaron las primeras lecturas, así sucesivamente hasta las 12 horas y culminar las 48 horas.

Figura 9.- Toma de primeras lecturas



12) Nuevamente pesamos las bolsas junto con las muestras degradadas.

Figura 10.- Secado de bolsas al aire libre



13) Y finalmente lavamos de los frascos, y posteriormente guárdalos para el próximo a utilizar.

4.8.- Sustrato y tratamientos

El sustrato (dietas) utilizado en este estudio se secó a 60 °C durante 48 h antes de la incubación *in vitro*. El nivel de dieta fue de 0, 6, 12 y 18% de ensilado de pescado diablo (DF) de materia seca dietética (MS) y representado como DF0, DF6, DF12 y DF18, respectivamente. Además, se utilizaron tres dosis (0, 1, 3 mL/g de sustrato DM) de *S. saprophyticus* (SS) a 5×10^{11} UFC/g representados como SS0, SS1 y SS3 para la fermentación *in vitro*. La formulación de la dieta y la composición química de las dietas se muestran en el cuadro 1.

El pescado fresco vivo se obtuvo del municipio de la laguna de Tuxpan de la ciudad de Iguala Gro. El pescado fue lavado con agua para eliminar el suelo y las partículas pegadas a los peces. Después del proceso de molienda, se mezclaron 5 kg de pescado con 14 litros de melaza y 1 litro de yogurt natural en un cubo con una capacidad de 20 litros en el que se colocó una tapa hermética para evitar fugas y entradas de aire, y luego se mantuvo durante 30 días. La cubeta se abrió al cabo de 30 días y se mezcló con los ingredientes mencionados en el cuadro 5.

4.9.- Incubación *in vitro*

Se alimentó a los caballos con la dieta compuesta (sustrato) ad libitum y se les suministró agua dulce durante 7 días antes de la fase de recogida. El contenido fecal (fuente de inóculos) recogido del recto se obtuvo de Cuatro caballos Azteca (5–8 años, 480 20.1 kg).

Cuadro 5: Ingredientes y composición química de las dietas con diferentes niveles de ensilados de pescado diablo utilizados como sustratos¹

Ingrediente	DF0	DF6	DF12	DF18
Maíz molido	73.5	67.5	61.5	55.5
Pastos	15	15	15	15
Harina de soya	9	9	9	9
Pescado de diablo	0	6	12	18
Minerales	2.5	2.5	2.5	2.5
Composición química (%)				
Materia orgánica	3.4	3.5	4.01	4.10
Proteína cruda	45.3	45.5	46.2	47.9
Extracto estéreo	11.4	12.2	11.3	12.13
Fibra ácida detergente	2.7	2.8	2.7	3.1
Fibra neutra detergente	4.7	4.9	4.89	5.02
Detergente ácido lignin	2.1	2.3	2.1	2.3
Minerals ²	34.7	34.7	34.7	34.7

¹Adapted from Elghandour MMY et al, 2014,

2Cu: 21.18 ppm, Fe: 4971.66 ppm, Zn: 343.75 ppm, Ca: 9.96%, Mg: 0.2495%, K: 0.8895%, Na: 1.296%, Pb: 0.0029%, P: 14.395%, S: 3.125%

El caldo de cultivo se añadió al contenido fecal en una proporción de 4:1 y se mantuvo bajo CO₂ durante todo el proceso de incubación *in vitro* (39°C; 48 h). Todas las incubaciones se realizaron por triplicado y se utilizó líquido ruminal o fecal como blanco. Se utilizaron datos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 y 48 horas utilizando la técnica de lectura de presión para estimar las emisiones totales de gas, CO₂, CH₄ y CO₂ (Theodorou MK et al, 1994). Las concentraciones de CO₂, CH₄ y H₂ también se midieron en el espacio de las botellas hasta 48 h utilizando el detector de gases (AIR QUALITY MONITOR YesAIR, Critical Environment Technologies Canadá., Delta, BC, V4G 1M3, Canadá). Además, se midió el pH y se estimó la degradabilidad MS (DMS) después de la filtración (Elghandour MM et al, 2014).

4.10.- Cálculos y análisis estadísticos

Los parámetros cinéticos de la producción de gas (mL/g DM) se calcularon de acuerdo con (France J, 2000). Utilizando la opción NLIN (SAS et al, 2009). El DMS se calculó de acuerdo con la metodología (Menke et al, 1979). Los datos de fermentación fecal se estimaron como un diseño completamente aleatorio según la opción PROC GLM:

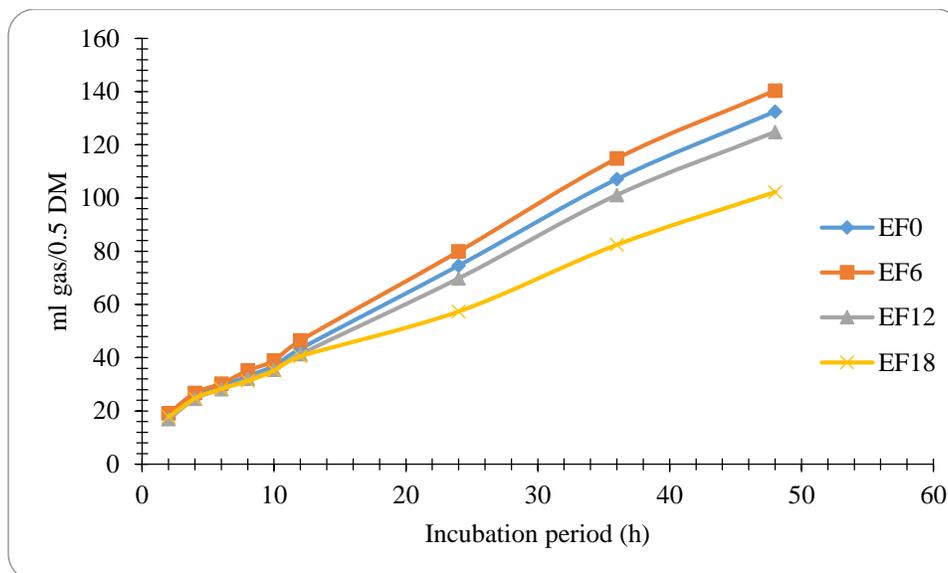
$$Y_{ij} = \mu + B_i + \varepsilon_{ij}$$

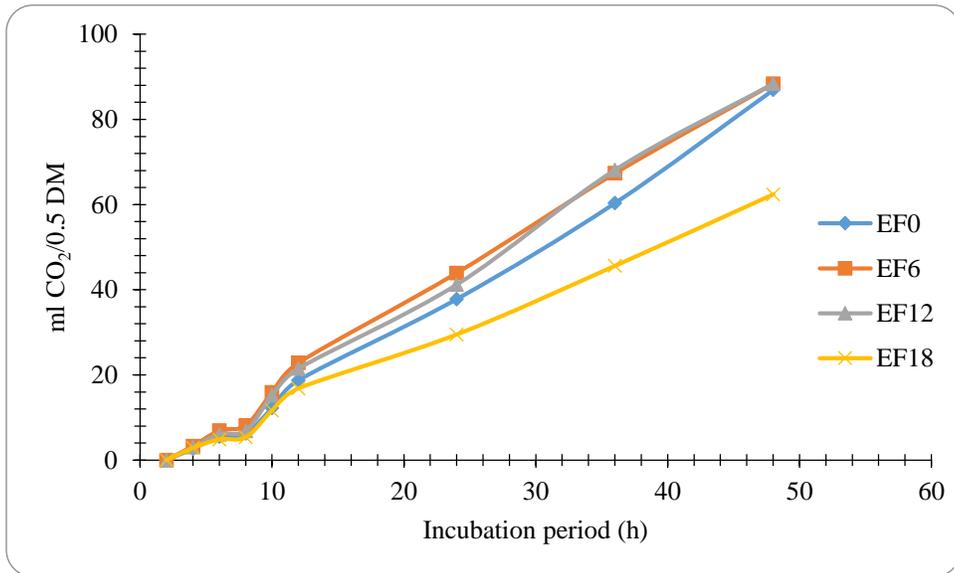
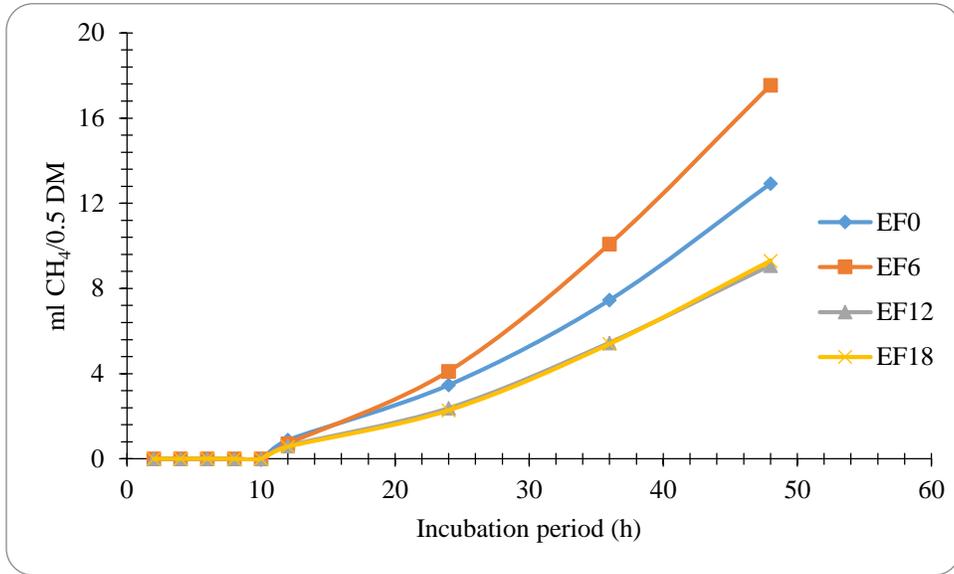
Donde, Y_{ij} = observación obtenida con el nivel i de LAB; B_i = nivel de LAB ($i = 1-4$); μ = media general; ε_{ij} = error experimental. Los contrastes polinómicos lineales y cuadráticos fueron implícitos para evaluar las respuestas para el aumento de las concentraciones de *S. saprophyticus*. La prueba de Turquía se utilizó para calcular comparaciones múltiples entre medias. El nivel de importancia se estimó en $P < 0.05$.

V.- RESULTADOS

5.1.- Cinética de gas *in vitro*

Las Figuras 1 y 2 mostraron el efecto del ensilado de pescado diablo y *S. saprophyticus* en la producción total de gases fecales para caballos, CH₄, CO₂ y H₂. La inclusión de *S. saprophyticus* no tuvo ningún efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la producción total de gas, CH₄, CO₂ y H₂. Además, el cuadro 2 mostró que el ensilado de pescado diablo tenía un efecto lineal ($P < 0.0001$) sobre la producción de gas asintótico ($P = 0.031$), la tasa de producción de gas y el tiempo de latencia ($P < 0.0001$). El DF6 mostró la mayor producción asintomática de gas y CO₂, mientras que el DF18 exhibió la menor producción de gas y emisión de CO₂. La interacción del pez diablo *S. saprophyticus* no tuvo ningún efecto ($P > 0.05$) sobre CH₄, CO₂ y H₂, excepto para la producción de gas asintótico ($P = 0.0017$) y el tiempo de retardo ($P = 0.039$).





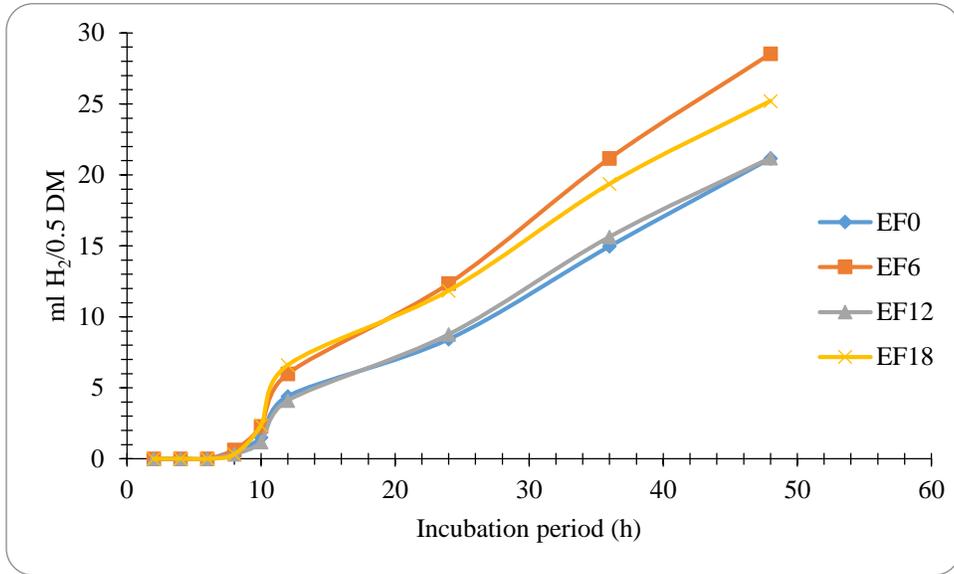
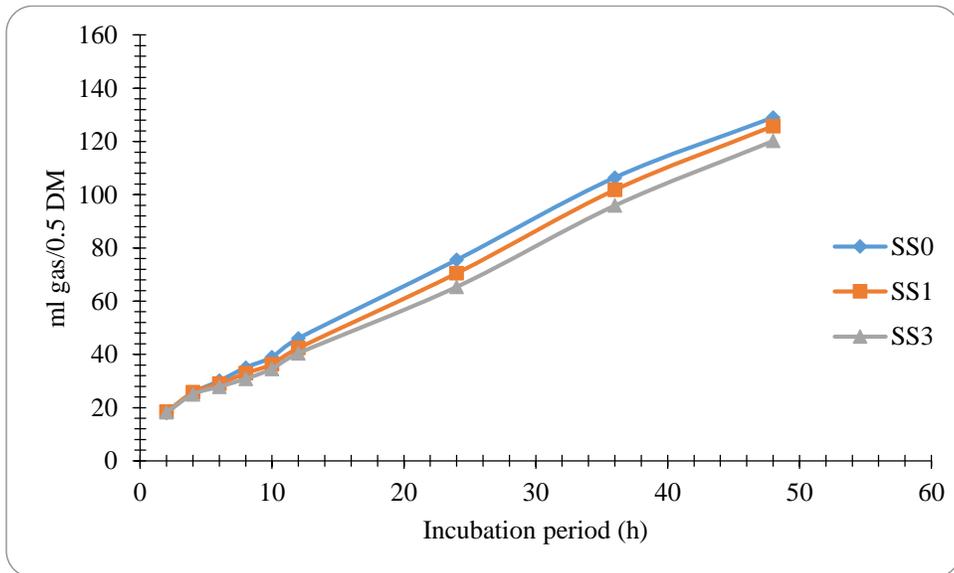
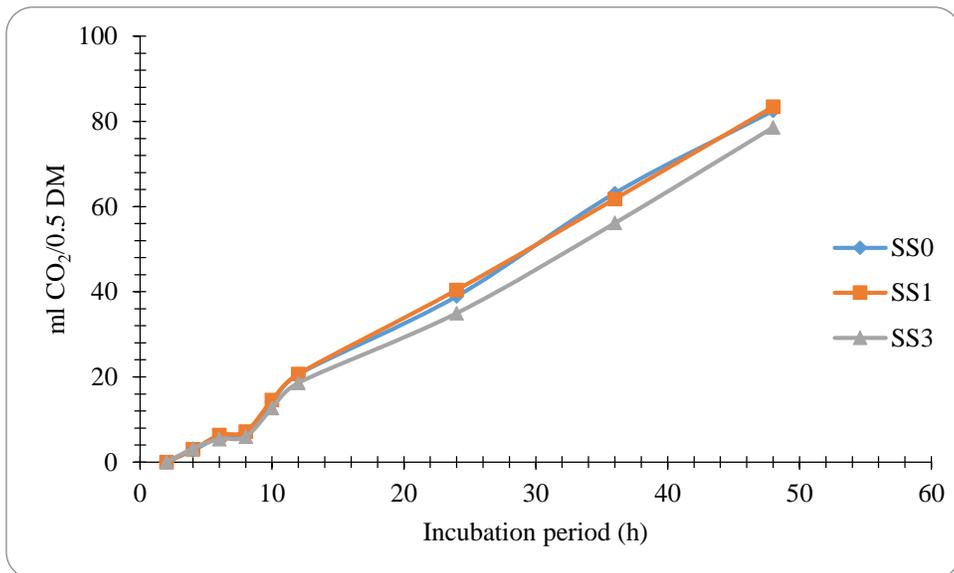
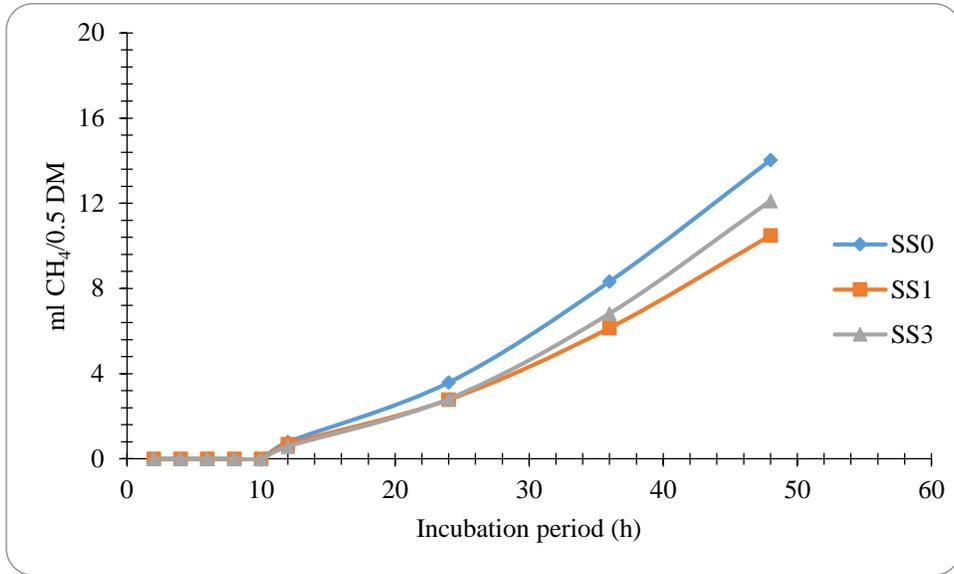


Figura 11: Producción total de gas fecal de caballo, CH₄, CO₂ y H₂ (ml / 0,5 g de MS) en diferentes períodos de incubación según la inclusión en la dieta de ensilados de pescado diablo (DF) a 0 (DF0, control), 6 (DF6), 12 (DF12) y 18% (DF18) de la dieta de materia seca





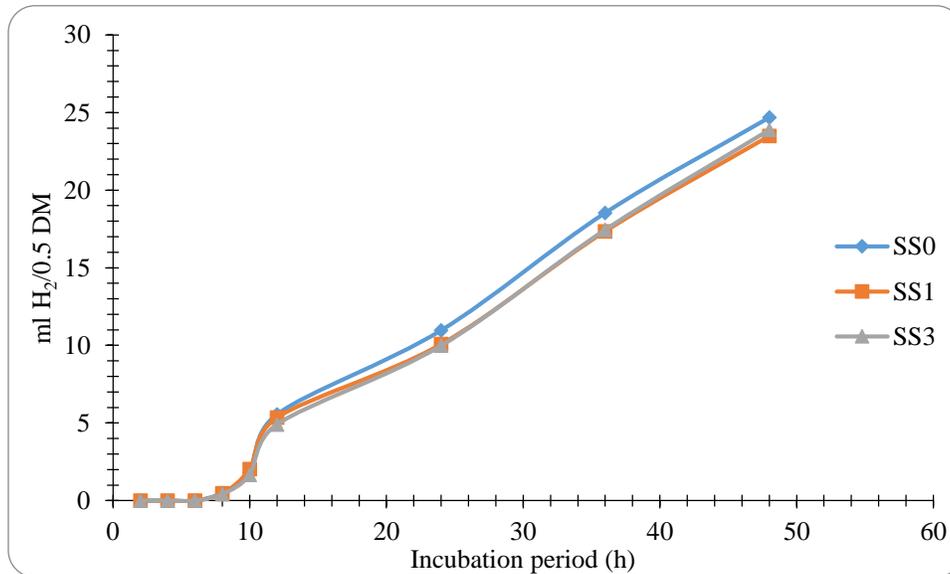


Figura 12: Producción total de gas fecal de caballo, CH₄, CO₂ y H₂ (ml / 0,5 g de MS) en diferentes períodos de incubación según la inclusión dietética de *S. saprophyticus* (SS) a 0 (SS0, control), 1 (SS1), y 3 ml (SS3) de la materia seca de la dieta.

5.2.- Parámetros de fermentación fecal

El suplemento de pez diablo mostró un efecto lineal ($P < 0.0001$) sobre el pH y la producción de gas a las 24 y 48 h. El DF12 y DF0 mostraron los valores de pH más altos y más bajos, respectivamente. Además, las dosis de DF6 y DF18 dieron como resultado la más alta y la más baja de mL gas/0.5 g MS a 24 y 48 h. Asimismo, *S. saprophyticus* tuvo un efecto lineal ($P < 0.05$) en la producción de gas, pero no tuvo efecto ($P > 0.05$) en el pH fecal. Se registró una disminución lineal ($P < 0.05$) de la producción de gas en dosis dependientes a las 24 y 48 h. El pez diablo *S. saprophyticus* estimó el efecto lineal ($P < 0.002$) sobre la producción de gas (mL/0.5 g MS) a las 48 h de incubación

Cuadro 6: Efecto de *S. saprophyticus* (SS) como aditivos alimentarios sobre el gas total fecal *in vitro*, CH₄, CO₂ y H₂ cinética de las dietas a diferentes inclusiones de ensilados de pescado diablo (DF)

DF dosificación	SS dosis	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>
DF0	0	128.6	0.008	4.439	10.4	0.001	5.908	89.7	0.004	4.409	15.8	0.011	6.750
	1	132.8	0.003	6.042	11.9	0.001	6.941	78.1	0.001	4.844	18.2	0.007	6.695
	3	128.5	0.010	4.989	12.7	0.001	7.662	90.2	0.001	4.692	23.6	0.027	6.913
DF6	0	143.8	0.009	3.764	20.4	0.023	7.990	88.6	0.011	4.265	28.5	0.007	6.206
	1	132.8	0.005	4.370	13.7	0.001	7.761	91.8	0.012	2.957	23.1	0.020	5.815
	3	135.8	0.005	1.965	18.0	0.020	8.098	81.2	0.004	3.800	30.9	0.013	5.279
DF12	0	136.3	0.003	2.072	16.3	0.001	6.882	88.0	0.009	4.278	25.5	0.016	9.479
	1	133.3	0.004	6.276	4.8	0.001	7.560	97.1	0.006	3.643	21.0	0.013	5.712
	3	91.8	0.009	1.724	3.0	0.002	8.837	77.1	0.003	3.930	13.5	0.007	6.859
DF18	0	88.9	0.001	1.753	7.5	0.011	8.220	60.2	0.012	4.460	24.6	0.020	6.848
	1	98.9	0.004	1.632	7.6	0.001	5.079	62.8	0.010	3.988	24.1	0.018	6.070
	3	105.3	0.002	1.917	28.4	0.005	9.203	62.0	0.005	3.087	24.0	0.009	6.416
<i>P</i> s valores:													
DF:													
Lineal		<.0001	0.0307	<.0001	0.8301	0.446	0.3764	<.0001	0.0307	0.2095	0.1949	0.8764	0.6646
cuadrático		0.1532	0.6781	0.8436	0.6575	0.7236	0.3636	0.0012	0.9366	0.5882	0.6087	0.4613	0.2863
SS:													
Lineal		0.0557	0.4179	0.5026	0.3539	0.6908	0.0721	0.2886	0.0455	0.3868	0.854	0.9329	0.1695
Cuadrático		0.252	0.2624	0.0008	0.2567	0.1087	0.0787	0.3884	0.6551	0.5872	0.5476	0.8841	0.1988
DF x SS		0.0017	0.3773	0.0392	0.3405	0.6714	0.2263	0.1323	0.9699	0.8475	0.4522	0.2551	0.5215

El pez diablo, *S. saprophyticus*, y el pez diablo *S. saprophyticus* interacción no mostró ningún efecto significativo en la DMS. Del mismo modo, *S. saprophyticus* no influyó en el pH del líquido ruminal (Tabla 3)

5.3.- Producción fecal de gases de efecto invernadero

La Tabla 4 mostró que las dosis de peces diablo, las concentraciones de *S. saprophyticus*, y la interacción de *S. saprophyticus* no tuvieron efecto lineal ni cuadrático ($P > 0.05$) en mL CH₄/0.5g MS incubado, mL CH₄/0.5 g MS degradado, producción proporcional de CH₄. A las 8 h del período de incubación, hubo ausencia completa de producción de CH₄ fecal *in vitro*. Sin embargo, el pescado del diablo y las dosis de *S. saprophyticus* revelaron una reducción cuantitativa en la producción de CH₄ (Fig. 2).

El cuadro 5 mostró que las dosis de peces diablo tenían un efecto lineal ($P < 0.05$) sobre mL CO₂/0.5 g MS incubado y mL CO₂/0.5 g MS degradado, pero no mostraron ningún efecto en la producción proporcional de CO₂. El DF6 y el DF12 revelaron el mL CO₂/0.5g degradado y mL CO₂/0.5g MS incubado, mientras que el DF18 exhibió el mínimo mL CO₂/0.5g MS degradado y mL CO₂/0.5g MS incubado a las 24 y 48 h de incubación. Además, la interacción entre los peces diablo *S. saprophyticus* tuvo un efecto lineal ($P < 0.05$) sobre la concentración de CO₂/0.5 g degradada y la producción proporcional de CO₂ con DF6 que presentaba la mayor producción de CO₂, mientras que DF18 mostraba la menor producción de CO₂. Sin embargo, *S. Saprophyticus* no estimó un impacto significativo ($P > 0.05$) en las emisiones de CO₂ (Fig. 2).

El cuadro 6 mostró que las dosis de peces diablo tenían una influencia lineal ($P < 0.02$) en la producción proporcional de H₂. El DF18 produjo el H₂ más alto, mientras que el DF0 cuantificó la producción de H₂ más baja.

Cuadro 7: Efecto de *S. Saprophyticus* (SS) como aditivos alimentarios sobre parámetros de fermentación fecal *in vitro*, así como GP total en diferentes períodos de incubación, usando diferentes inclusiones de ensilados de pescado (DF)

DFdosificación	SS dosis	Parámetros de fermentación				Producción de gas mL / 0.5g. materia seca incubada				Producción de gas mL / 0.5g. materia seca degradada			
		pH	DMS ¹	8	12	24	48	8	12	24	48		
DF0	0	6.3	73.4	36.7	48.1	78.3	129.9	26.9	35.2	57.5	95.5		
	1	6.3	76.8	32.3	41.4	72.9	131.9	24.9	32.0	56.2	101.5		
	3	6.4	74.8	30.3	40.7	72.7	135.7	22.7	30.5	54.4	101.5		
DF6	0	6.6	77.5	37.0	49.1	86.6	148.7	28.6	38.0	67.1	115.3		
	1	6.5	77.5	34.8	47.1	79.3	136.2	27.0	36.5	61.5	105.6		
	3	6.6	76.2	33.8	43.4	73.8	136.3	25.8	33.0	56.2	103.8		
DF12	0	6.6	76.8	36.4	46.8	79.3	137.5	27.9	35.9	60.8	105.5		
	1	6.6	78.7	32.7	42.4	72.2	134.5	25.7	33.4	56.8	105.9		
	3	6.6	75.4	27.4	35.0	58.0	102.6	20.7	26.4	43.8	77.4		
DF18	0	6.6	78.2	30.1	40.2	57.7	99.8	23.5	31.4	45.1	78.0		
	1	6.5	66.7	32.0	38.8	57.6	100.6	21.4	26.3	38.7	67.8		
	3	6.5	72.9	31.8	42.7	56.9	106.4	23.2	31.1	41.8	77.8		
<i>P</i> valores:													
DF:													
Lineal		<.0001	0.4416	0.2547	0.1813	<.0001	<.0001	0.1842	0.1733	0.0001	<.0001		
Cuadrático		<.0001	0.2469	0.9638	0.7489	0.1128	0.0167	0.477	0.6607	0.0798	0.0333		
SS:													
Lineal		0.2386	0.5432	0.0046	0.0041	0.0002	0.0061	0.0127	0.0135	0.0037	0.0507		
Cuadrático		0.038	0.7678	0.9985	0.6017	0.9759	0.6453	0.9034	0.6828	0.9899	0.8136		
DF x SS		0.3319	0.554	0.1949	0.1628	0.0978	0.0002	0.6221	0.4442	0.3747	0.0345		

Cuadro 8: Efecto de *S. saprophyticus* (SS) como aditivos alimentarios en la producción de CH₄ fecal *in vitro* en diferentes periodos de incubación utilizando diferentes inclusiones de ensilados de pescado diablo (DF)

DFdosificación	SS dosis	mL CH ₄ / 0.5 g de materia seca incubada			mL CH ₄ / 0.5g materia seca degradada			Producción proporcional de CH ₄		
		12	24	48	12	24	48	12	24	48
DF0	0	0.8	3.2	11.8	0.6	2.4	8.7	1.7	4.1	9.1
	1	1.3	4.0	12.8	1.0	3.1	9.9	3.0	5.4	9.8
	3	0.6	3.2	14.1	0.4	2.4	10.7	1.4	4.4	10.4
DF6	0	0.8	4.5	19.0	0.6	3.5	14.8	1.5	5.2	12.5
	1	0.4	3.2	14.5	0.3	2.5	11.3	0.8	4.0	10.4
	3	1.0	4.6	19.1	0.7	3.5	14.5	2.2	6.1	13.9
DF12	0	0.7	4.2	17.2	0.6	3.2	13.2	1.6	5.2	12.6
	1	0.6	1.8	6.1	0.5	1.4	4.8	1.4	2.5	4.5
	3	0.5	1.2	3.9	0.3	0.9	2.9	1.2	2.0	3.8
DF18	0	0.9	2.4	8.1	0.7	1.9	6.3	2.1	4.2	8.0
	1	0.5	2.1	8.5	0.4	1.5	6.2	1.3	3.6	8.3
	3	0.3	2.3	11.3	0.2	1.6	8.1	0.7	4.1	10.7
<i>P</i> valores :										
DF:		0.53	1.39	5.25	0.42	1.11	4.13	1.14	1.68	3.71
Lineal		0.2246	0.0811	0.1557	0.2199	0.0839	0.1498	0.2512	0.4026	0.6746
Cuadrático		0.5725	0.3876	0.3511	0.6307	0.4802	0.4475	0.5462	0.1393	0.1267
SS:										
Lineal		0.3329	0.1848	0.3794	0.3241	0.1695	0.3198	0.4788	0.4373	0.5902
Cuadrático		0.9467	0.4069	0.1772	0.9143	0.471	0.2167	0.8733	0.36	0.1645
DF × SS		0.4385	0.3163	0.1378	0.4365	0.3615	0.1702	0.3139	0.2499	0.1515

Cuadro 9: Efecto de *S. saprophyticus* (SS) como aditivos alimentarios en la producción de CO₂ fecal *in vitro* en diferentes períodos de incubación usando diferentes inclusiones de ensilados de pescado diablo (DF)

DF dosificación	S S d os es	mL CO ₂ / 0,5 g de materia seca				mL CO ₂ / 0,5 g de materia seca degradada				Producción proporcional de CO ₂			
		8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
DF0	0	6.9	21.7	39.5	90.4	5.1	15.8	29.0	66.3	18.7	44.7	50.2	69.5
	1	5.3	16.1	34.5	79.1	4.0	12.4	26.4	60.4	17.0	39.7	48.2	60.3
	3	6.5	18.4	39.4	91.4	4.9	13.8	29.5	68.3	21.7	45.3	54.2	67.4
DF6	0	8.1	22.2	45.5	89.5	6.2	17.2	35.2	69.3	21.7	45.3	52.5	60.5
	1	10.1	26.1	48.8	92.9	7.8	20.2	37.8	72.0	29.0	55.3	61.6	68.4
	3	6.1	20.2	37.5	82.6	4.6	15.4	28.6	62.9	18.0	46.7	50.8	60.6
DF12	0	6.8	22.2	41.9	89.2	5.2	17.0	32.2	68.5	18.3	47.3	52.9	65.0
	1	8.1	24.4	46.6	98.1	6.3	19.2	36.8	77.4	24.7	57.7	64.6	72.9
	3	5.8	17.9	35.0	77.8	4.4	13.5	26.4	58.7	21.3	51.7	60.8	76.1
DF18	0	5.3	16.4	28.8	60.8	4.2	12.8	22.5	47.6	17.7	40.9	49.9	61.0
	1	5.3	16.1	31.7	63.7	3.6	10.9	21.4	42.1	16.7	41.9	55.5	63.7
	3	5.4	17.9	27.9	62.7	3.9	13.1	20.5	46.0	17.0	42.0	49.2	58.9
<i>P</i> values:													
DF:													
Lineal		0.2025	0.1346	0.0014	<.0001	0.1500	0.1055	0.0029	<.0001	0.2771	0.5155	0.8331	0.2309
Cuadrático		0.0759	0.0021	0.0009	0.001	0.0269	0.0009	0.0007	0.0005	0.0427	0.0001	0.0072	0.0217
SS:													
Lineal		0.1707	0.0745	0.0598	0.3033	0.1237	0.0643	0.0656	0.2301	0.7914	0.3955	0.4048	0.5968
Cuadrático		0.117	0.2578	0.0556	0.3705	0.1116	0.278	0.1015	0.4818	0.0717	0.1048	0.0552	0.6017
DF x SS		0.0799	0.0162	0.1032	0.1218	0.054	0.028	0.1714	0.1397	0.0412	0.1462	0.382	0.3221

Las dosis de *S. saprophyticus* y la interacción de *S. saprophyticus* ($P > 0.05$) no tuvieron un impacto significativo en mL H₂/0.5 MS incubado y mL H₂/0.5 g MS degradado. Por el contrario, las dosis de *S. saprophyticus* y la interacción de *S. saprophyticus* mostraron un efecto lineal ($P < 0.03$) en mL H₂/0.5 MS incubado a las 12 h (Fig. 2).

VI.- ANÁLISIS DE DISCUSIÓN

En la actualidad, la mejora de la nutrición mediante el uso de ingredientes no convencionales de cultivos o fuentes animales, nuevos aditivos y microorganismos son las prácticas más comunes de los investigadores y agricultores. Además, la reducción de la producción de gases de efecto invernadero también es un factor importante en las intervenciones nutricionales equinas. La producción total de gas es una indicación de la digestibilidad o degradación de los piensos. En este contexto, se estimó que la producción total de gas aumentaría debido a la suplementación del pescado diablo. El incremento de la producción total de gas por DF6 con respecto al control puede atribuirse a las actividades enzimáticas como la proteasa y la lipasa del pez diablo, lo que mejoró el crecimiento de microbios.

También podría deberse al hecho de que el alto contenido en proteínas conduce a una mayor disponibilidad de nitrógeno amónico, lo que mejoró su crecimiento. (Makkar et al 1995). Informaron de que la fermentación proteica producía menos gas que el carbohidrato. Por lo tanto, contrariamente a nuestro estudio, la mayor suplementación proteica resultó en la reducción de la producción de gas. (Velázquez et al). Afirmaron que el tiempo de Lag es una medida del tiempo necesario para la digestibilidad del alimento por los microbios intestinales para iniciar la digestibilidad

Cuadro 10: Efecto de *S. saprophyticus* (SS) como aditivos alimentarios en la producción de H₂ fecal *in vitro* en diferentes períodos de incubación utilizando diferentes dosis de ensilados de pescado diablo (DF)

DF dosificación	SS do ses	mL H ₂ / 0.5 materia seca incubada				mL H ₂ / 0.5 g de materia seca degradada				Producción proporcional de H ₂			
		8	12	24	48	8	12	24	48	8	12	24	48
		DF0	0	0.11	4.22	7.77	16.89	0.09	3.14	5.78	12.55	0.33	9.00
	1	0.89	4.67	9.03	22.60	0.69	3.66	7.07	17.61	2.67	10.67	12.0	17.00
	3	0.75	4.34	8.48	23.99	0.56	3.26	6.37	17.97	2.67	10.67	11.6	17.67
DF6	0	1.24	5.91	11.85	29.48	0.96	4.58	9.19	22.87	3.33	12.00	13.6	19.67
	1	0.35	5.63	10.81	23.96	0.27	4.37	8.39	18.59	1.00	12.00	13.6	17.67
	3	0.34	6.47	14.38	32.17	0.26	4.93	10.96	24.52	1.00	15.00	19.6	23.67
DF12	0	0.36	5.56	11.79	26.69	0.28	4.25	9.02	20.45	1.00	11.67	14.6	19.33
	1	0.33	3.96	8.20	22.02	0.26	3.10	6.44	17.35	1.00	9.33	11.3	16.33
	3	0.27	2.78	6.30	14.86	0.21	2.10	4.76	11.21	1.00	8.00	10.6	14.33
DF18	0	0.30	6.56	12.49	25.68	0.24	5.12	9.76	20.08	1.00	16.33	21.6	25.67
	1	0.32	7.17	12.29	25.41	0.21	5.01	8.50	17.43	1.00	18.00	21.0	25.00
	3	0.32	6.06	10.76	24.52	0.23	4.34	7.88	17.89	1.00	14.00	18.6	23.00
<i>P</i> valores:													
DF:													
Lineal		0.1937	0.0279	0.089	0.3036	0.1737	0.0702	0.1574	0.4507	0.1701	0.0197	0.0045	0.0018
Cuadrático		0.4763	0.0956	0.4194	0.5556	0.5171	0.1751	0.5543	0.7401	0.4222	0.02	0.0485	0.1252
SS:													
Lineal		0.6329	0.429	0.5578	0.8118	0.5744	0.3693	0.4958	0.6949	0.895	0.965	0.8423	0.9422
Cuadrático		0.9496	0.8646	0.7878	0.7869	0.9532	0.9041	0.7604	0.7697	1.000	0.2672	0.774	0.7695
DF x SS		0.0589	0.787	0.6738	0.4525	0.0599	0.8652	0.7372	0.5049	0.099	0.236	0.6734	0.6997

En esta investigación, el tiempo de Lag se redujo durante el ensilado debido al proceso de fermentación. El menor tiempo de Lag con la suplementación de pez diablo puede atribuirse a la capacidad de los microbios para adaptar o revelar rasgos probióticos (Borah D et al 2016). Por lo tanto, se podría decir que el pez diablo tenía algunas propiedades probióticas, que condujo a una rápida adherencia y colonización de partículas de alimento en comparación con el control.

En este estudio, las emisiones totales de CO₂ de los caballos se redujeron en presencia de altas inclusiones del pescado diablo.

La mayor producción total de CO₂ en DF12 y su similitud con DF6 podría deberse al proceso de fermentación. Sin embargo, el CO₂ total más bajo de la DF18 puede atribuirse al alto contenido de proteínas en bruto del pescado diablo. El patrón similar se observó en mL CO₂/0.5 g MS incubado y degradado también (Tabla 5). (Velázquez et al 2016). Demostraron que la menor producción de CO₂ puede verse influida por el alto contenido de proteínas en una dieta. Además, la acumulación de nitrógeno de amoníaco-N en el medio podría haber impedido la liberación de CO₂ en la botella (Cone JW et al).

(Faniyi et al 2019). Informaron de que el pH es un parámetro de fermentación que cuantifica el estado de acidez y alcalinidad en el intestino y durante la fermentación. Del mismo modo, las características de un alimento consumido por un animal influyen en el pH. En otras palabras, durante el ensayo *in vitro*, el pH del líquido está influenciado por las características del sustrato. En la presente investigación, el valor del pH se incrementó debido a la suplementación de dosis variadas de peces diabólicos. El aumento del pH con suplementos de pescado diablo puede atribuirse a la alta proteína y bajo carbohidrato en el sustrato fermentado, en comparación con el control, que tenía maíz molido más alto (Russell WR et al, 2011 y Den Besten G et al, 2013).

(Elghandour et al 2019). Informaron de que la eliminación de H₂ estimula las bacterias durante la digestión. Esto indica que el H₂ proporcional más alto en DF18 durante el período de incubación podría haber afectado la digestión. Por el contrario, el gas H₂ superior en DF6 podría ser una indicación de producción de más acetato y butirato cuando se produce H₂ en el proceso (Elghandour MMY et al, 2016). La reducción numérica de la producción de CH₄ a 24 horas de incubación por DF12 y DF18 puede atribuirse a la menor producción de CO₂ y gas H₂.

(Borah et al, 2016). Habían informado de la actividad antagónica de algunas especies de *Staphylococcus*. En el presente estudio, observamos menor producción de gas (mL/0.5 g MS incubado y degradado) con dosis crecientes de *S. saprophyticus*. Esto indica que *S. saprophyticus* tenía algunas propiedades antimicrobianas inherentes e inhibidores del crecimiento. Además, (Khusro et al, 2018). Informaron de que *Staphylococcus* sp. Mostraba falta de actividad amilolítica, lo que mostraba su incapacidad para degradar el almidón. Por lo tanto, la menor producción de gas con la suplementación de *S. Saprophyticus* puede atribuirse al hecho de que las bacterias no pueden degradar el almidón. Además, (Laukova y Marekova 1993).

(Sung et al. 2009, y Khusro et al. 2018). Habían informado de que las cepas del SNC son productores ideales de bacteriocinas. Así, la bacteria producida por *S. saprophyticus* podría haber inhibido los microorganismos fermentativos. El suplemento de *S. saprophyticus* a dosis distintas reveló una reducción en la emisión de CH₄ Producción baja de CH₄ con *S. Saprophyticus* suplementación puede explicarse por su capacidad para reducir el nitrato a nitrito (Mauriello G et al, 2004, y Casaburi A et al, 2005). Además, el presente estudio mostró que la suplementación con *S. saprophyticus* no tuvo un impacto significativo en las emisiones de CO₂ y H₂. La presencia de *Staphylococcus* podría haber mejorado la formación que serviría como receptores terminales de electrones durante la fermentación de los piensos (Sakthivel PC et al, 2012).

En los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo no sólo para mejorar la calidad nutricional, sino también para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero procedentes del ganado mediante la función sinérgica de los aditivos. A este respecto, se ha investigado con éxito el papel sinérgico de los forrajes fibrosos junto con las levaduras vivas y las enzimas fibrolíticas para mejorar la fermentación y mitigar las emisiones de CH₄ y CO₂ de los equinos (Elghandour MMY et al, 2014 y Kholif AE et al, 2016). La presente investigación colmó aún más la laguna de la investigación equina al evaluar el papel sinérgico fundamental del pescado diablo y *S. saprophyticus*, como aditivos para piensos prometedores en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero procedentes de los caballos.

VII.- CONCLUSIONES

La inclusión del pescado diablo al 6% de la dieta puede mejorar la producción de gas para dietas, sin interrumpir el pH intestinal. La suplementación de DF12 y DF18 redujo la producción de CH₄ en 58.24 y 59.33%, respectivamente. DF18 redujo la producción total de CO₂ en un 15.25%, mientras que SS1 y SS3 redujeron la producción de CH₄ en un 50.54 y 58.24%, respectivamente. Del mismo modo, el bajo patrón de producción de gas con suplementación de *S. saprophyticus* indica sus propiedades antimicrobianas, lo que sugiere buenas perspectivas en la nutrición del ganado. El pez diablo y *S. saprophyticus* podrían ser aditivos potenciales para la alimentación animal como alternativas a los antibióticos convencionales.

VIII.-REFERENCIAS

1. Shepherd ML, Swecke Jr WS, Jr Jensen RV, Ponder MA. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiol Lett* 2012;326:62–8
2. Fombelle A, Varloud M, Goachet AG, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, Julliand V. Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. *Anim Sci* 2003;77:293-304.
3. Sadet-Bourgeteau S, Julliand V. Equine microbial gastro-intestinal health in: the impact of nutrition on the health and welfare of horses. In: Presented at the 5th European Workshop equine nutrition, EAAP Scientific Series, Cirencester, United Kingdom; 2010; p. 161-182.
4. Cipriano-Salazar M, Adegbeye MJ, Elghandour MMY, Barbabosa-Pilego A, Mellado M, Hassan A, Salem AZM. The dietary components and feeding management as options to offset digestive disturbances in horses. *J Equine Vet Sci* 2019;74:103-10
5. Rowe JB, Lees MJ, Pethick DW. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J Nutr* 1994;124:2742-4.
6. Mungall BA, Kyaw-Tanner M, Pollitt CC. *In vitro* evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. *Vet Microbiol* 2001;79:209–23.
7. Elghandour MMY, Vazquez JC, Salem AZM, Kholif AE, Cipriano MM, Camacho LM, Marquez O. *In vitro* gas and methane production of two mixed

- rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Anim Res 2017;45:389-95.
8. Cedillo J, Kholif AE, Salem AZM, Elghandour MMY, Vazquez JF, Alonso MU, Barbabosa A, Chagoyan JCV, Reyna AG. Oral administration of Sauce Iloron extract to growing lambs to control gastrointestinal nematodes and *Moniezia* spp. Asian Pac J Trop Med 2015;8:520-5.
 9. Vallejo LH, Salem AZM, Kholif AE, Elghangour MMY, Fajardo RC, Rivero N, Bastida AZ, Mariezcurrena MD. 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.
 10. Elghandour MMY, Khusro A, Greiner R, Salem AZM, Lugo de la Fuente J, Marquez-Molina O, Barbabosa-Pilego A, Montes-de-Oca Jimenez R. Horse fecal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics influenced by *Lactobacillus farciminish* supplemented diet. J Equine Vet Sci 2018;62:98-101.
 11. Khusro A, Aarti C, Barbabosa-Pilego A, Hernández SR. Anti-pathogenic, antibiofilm, and technological properties of fermented food associated *Staphylococcus succinus* strain AAS2. Prep Biochem Biotech 2019;49:176-83
 12. EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA1. Opinion of the Scientific Committee (Question No EFSA-Q-2005-293. EFSA J. 2007;587:1–16. Retrieved from www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/587.pdf
 13. Khusro A, Aarti C, Salem AZM, Rodríguez GB, Rivas-Cáceres RR. Antagonistic trait of *Staphylococcus succinus* strain AAS2 against

uropathogens and assessment of its *in vitro* probiotic characteristics. *Microb Pathog* 2018;118:126–32

14. Guan L, Cho KH, Lee JH. Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol* 2011;28:101–13.
15. Avdalov N, Barlocoo N, Bauza R, Giacommeti L, Panucio A. Evaluación del ensilaje biológico de pescado en la alimentación de cerdos en engorde. Instituto Nacional de Pesca. Segunda consulta de expertos sobre tecnología de productos pesqueros en América latina. Montevideo, Uruguay. 1989; pp. 88-98.
16. Borah D, Gogoi O, Adhikari C, Kakoti BB. Isolation and characterization of the new indigenous *Staphylococcus* sp. DBOCP06 as a probiotic bacterium from traditionally fermented fish and meat products of Assam state. *Egypt J Basic Appl Sci* 2016; 3:232–40.
17. Tejeda-Arroyo E, Cipriano-Salazar M, Camacho-Díaz LM, Salem AZM, Kholif AE, Elghandour MMY, DiLorenzo N, Cruz-Lagunas B. Diet inclusion of devil fish (*Plecostomus* spp.) silage and its impacts on ruminal fermentation and growth performance of growing lambs in hot regions of Mexico. *Trop Anim Health Prod* 2015;47:861–6
18. 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 Tech* 1994;48:185-97.

19. Elghandour MM, Chagoyan JCV, Salem AZM, Kholif AE, Castañeda JSM, Camacho LM, Cerrillo-Soto MA. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. Ital J Anim Sci 2014;13:295-301.
20. France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, Lopez 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.
21. SAS. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, NC. 2002.
22. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J Agric Sci Cambridge 1979;93:217-22.
23. Makkar HPS, Blümmel M, Becker K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins and their implications in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. Br J Nutr 1995;73:897-933
24. Velazquez AE, Elghandour MMY, Adegbeye MJ, Pilego AB, Vallejo LH, Salem AZM, Salazar MC. Influence of dietary inclusion with corn and soybean oils, in combination with live yeast culture, on horse fecal methane, carbon dioxide and hydrogen production. J Equine Vet Sci 2019;74:42-50

25. Velázquez AE, Kholif AE, Elghandour MMY, Salem AZM, de Oca Jiménez RM, Pliego AB, Odongo N, Bórquez JL, Cipriano M, Olivares J. 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.
26. Cone JW, Van Gelder AH, Bachmann H. Influence of inoculum source dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. In: *Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity. Proceedings of the EAAP Satellite Symposium on Gas Production, Wageningen, The Netherlands Proc Br Soc Anim Sci* 200; pp. 15-16.
27. Faniyi TO, Adegbeye MJ, Elghandour MMY, Pilego AB, Salem AZM, Olaniyi TA, Adediran O, Adewumi MK. 2019. Role of diverse fermentative factors towards microbial community shift in ruminants. *J Appl Microbiol* 2019;30:1-10.
28. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, Duncan G, Johnstone AM, Lobley GE, Wallace RJ, Duthie GG, Flint HJ. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1062-72.
29. Den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 2013;54:2325-40.
30. Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, de Oca RM, Barbabosa A, Mariezcurrena M, Olafadehan OA. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J Clean Prod* 2016;135:194-200.

31. Monteiro ALG, da Fonseca Faro AMC, Peres MTP, Batista R, Poli CHE, Villalba JJ. The role of small ruminants on global climate change. *Acta Scient Anim Sci* 2018;40:1-11.
32. Laukova´ A, Marekova´ M. Antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substances produced by rumen staphylococci. *Folia Microbiol* 1993;38:74–6.
33. Sung C, Kim BG, Kim S, Joo HS, Kim PI. Probiotic potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 as anti-*Staphylococcus aureus* agent isolated from the vaginal microbiota of a healthy woman. *J Appl Microbiol* 2009;108:908–16.
34. Mauriello G, Casaburi A, Blaiotta G, Villani F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci* 2004;67:149–58.
35. Casaburi A, Blaiotta G, Mauriello G, Pepe O, Villani F. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Sci* 2005; 71:643–50.
36. Sakthivel PC, Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC. Effect of sodium nitrate and nitrate reducing bacteria on *in vitro* methane production and fermentation with buffalo rumen liquor. *Asian-Aust J Anim Sci* 2012;25:812–7.
37. Elghandour MMY, Vázquez Chagoyán JC, Salem AZM, Kholif AE, Castañeda JSM, Camacho LM, Buendía G. *In vitro* fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Equine Vet Sci* 2014;34:619–25

38. Elghandour MMY, Kholif AE, López S, Mendoza GD, Odongo NE, Salem AZM. *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* 2016;38:64–71
39. Kholif AE, Baza-García LA, Elghandour MMY, Salem AZM, Barbabosa A, Dominguez-Vara IA, Sanchez-Torres JE. *In vitro* assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J Equine Vet Sci* 2016;39:44–50
40. Beuvink J M, Spoelstra S F and Hogendorp J 1992 An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 40: 401-407.
41. Davies D R, Theodorou M K, Baughan J, Brooks A E and Newbold J R 1995 An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. *Annales de Zootechnie* 44: 36-45.
42. Rodríguez T, Montilla J, Bello R. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. Elaboración y evaluación biológica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 40(3);426-438. 1990a.
43. Menke K H and Steingass H 1988 Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*. 28: 7-55

44. Steel, G. R., y J. H. Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da edición. Ed. McGraw-Hill. México, D.F. pp: 167-171.
45. Theodorou M K, Williams B A, Dhanoa M S, McAllan A B and France J 1994 A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185-197.
46. Tilley J M and Terry R A 1963 A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*. 18: 104-111.
47. Getachew, G., E. J. De Peters, P. H. Robinson, and J. G. Fadel. 2005. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 547-55
48. Everardo Barba, 2018. Pez diablo en el sureste mexicano March 2015 *with* 242 Reads El Colegio de la Frontera Sur. https://www.researchgate.net/publication/324040814_Pez_diablo_en_el_sureste_mexicano
49. Antonio M. Low Pfeng Pedro A. Quijón Edward M. Peters Recagno, 2014 *Especies invasoras acuáticas: casos de estudio en ecosistemas de México* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) University of Prince Edward Island (UPEI)
50. Toledo Ocampo, A. 2005. Marco conceptual: caracterización ambiental del Golfo de México. P. 25-52. En: V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz- Hernández (eds.). *Golfo de México contaminación e*

impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. Segunda edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp

51. Alberto Nájar, 2011. El Pez Diablo amenaza a México BBC Mundo, Ciudad de México

52. Julio E Bermudez, Jairo H Rodriguez, Alvaro Ocampo y Lourdes Peñuela.1999.

53. Ensilaje de vísceras de pescado Cachama blanca (*Piaractus brachyponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos de engorde en una dieta con aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* - *Elaeis oleifera*) Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia a.ocampo@wye.ac.uk Fundación Horizonte Verde aocampo@villavicencio.cetcol.net.com

54. Salas RG*1 , Shimada MA2 , Flores PJ1 , Garcidueñas PR3 y Perea PM4. 2009. UTILIZACIÓN DEL ENSILADO ÁCIDO DEL PEZ DIABLO EN LA NUTRICIÓN DE CERDOS Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-UMSNH* gsalas55@hotmail.com 2 Iztacala-UNAM 3 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH 4 Estudiante de Doctorado-UAEM

55. Wakida-Kusunoki, Armando, y Luis Enrique Amador del Angel. 2011.«Aspectos biológicos del pleco invasor, *Pterygoplichthys pardalis*(Teleostei: Loricariidae) en el río Palizada, Campeche, Mexico.» Revista Meexicana de Biodiversidad 82, 2011: 870-878..

56. Oscar, Miranda Miranda,. 2010 «Ensilaje de pescado a partir de subproducto de la pesca no comerciable. Composición química y pH.» 2010.
57. Parra Huertas, Ricardo Adolfo. 2012. Yogur en la salud humana Revista Lasallista de Investigación, vol. 9, núm. 2, julio-diciembre, 2012, pp. 162-177 Corporación Universitaria Lasallista Antioquia, Colombia. Revista Lasallista de Investigación ISSN: 1794-4449 marodriguez@lasallista.edu.co Corporación Universitaria Lasallista Colombia
58. Parra Huertas, Ricardo Adolfo. 2012 Evaluación de melaza de caña como sustrato pontificia la producción de *Saccharomyces cerevisies* universidad javeriana facultad de ciencias básicas microbiología industrial bogota, D.C Agosto de 2007
59. Zech M. y Gorisch, H: 1995. Invertase from *Sacchromyces cerevisias* Reversible Inactivation by Componentes oJan V. 17.41-36p.
60. Kevin González. 2018. Anatomía Comparada Sesión No 10 Universidad Santo Tomas Sede Santiago Unidad de Anatomía Veterinaria 23 de septiembre 2018
61. Daniel R. Cortés. 2011. Características de los caballos en México Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro División de Ciencia Animal Departamento Recursos Naturales Renovables. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Abril de 2011

62. Benjamín A. Solís. 2014. Manual de prácticas de Zoorecna de Equinos. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Programa Educativo: Medicina Veterinaria y Zootecnia.
63. Marlin, D. y Nankervis, K. (2002): Equine exercise physiology. Ed. Blackwell Science Ltd. UK., pp. 94-126.
64. Canelón, J. L. 2005. Características fenotípicas del caballo criollo. observaciones en el estado Apure Archivos de Zootecnia, vol. 54, núm. 206-207, 2005, pp. 217-220 Universidad de Córdoba Córdoba, España
65. Canelón, J.L., J. Páez y C. Rojas. 2002. Morfometría del caballo Criollo en el Llano Apureño, zona alta del Edo. Lara y Parque Nacional Sierra Nevada. II Jornada Nacional para el Estudio y la Conservación del Caballo Criollo Venezolano “Dr. José A. Giacopini Zárraga” Barquisimeto. 02 de Noviembre 2002
66. De Armas, R. 1946. Caballo Criollo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay. pp: 177,179,183-187
67. Fondevila M. y Barrios, A. 2012 *Universidad de Zaragoza (España). Animal y Ciencia de los Alimentos Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (Brazil). Escola de Veterinaria extent V197-200(3*
68. S L Posada y R R Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes *Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias - Grupo de Investigación en*

*Ciencias Animales-GRICA, AA 1226, Medellín, Colombi
slposada@epm.net.com , ricardonoguera@agronica.udea.edu.com*