



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

INCLUSIÓN DE ACEITE DE CÁRTAMO Y DE PESCADO EN  
COMBINACIÓN CON LEVADURAS EN LA DIETA DE EQUINOS Y SU  
IMPACTO SOBRE LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO  
INVERNADERO (*in vitro*)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

**PMVZ JOSÉ ANGEL QUINTANA GARCÍA**

ASESORES

**DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR**

**DR. ABDELFAH ZEIDAN MOHAMED SALEM**

**DR. ALBERTO BARABABOSA PLIEGO**



Toluca, Estado de México, Septiembre 2021

## RESUMEN

### INCLUSIÓN DE ACEITE DE CÁRTAMO Y DE PESCADO EN COMBINACIÓN CON LEVADURAS, PARA LA DIETA DE EQUINOS Y SU IMPACTO SOBRE LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO (*in vitro*).

Este estudio fue realizado para determinar el efecto sinérgico de los aceites dietéticos (cártamo y aceites de pescado) y la levadura en la producción de biogás *in vitro* utilizando contenido cecal de caballos. En este estudio se utilizaron heces de caballos adultos del Hospital Veterinario de Grandes Especies como fuente de inóculos. Los aceites de cártamo y de pescado se complementaron con dos concentraciones diferentes (2,4 y 4,8%), mientras que *Saccharomyces cerevisiae* se complementó con 4 mg/g de materia seca en la dieta de alimentación. La producción de gas asintótico (PG), la tasa de producción de gas, y el período de (retraso) *L* no se vieron afectados ( $P > 0.05$ ) debido a la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado, y *S. cerevisiae*. La interacción del nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* mostró una mitigación significativa ( $P = 0.0437$ ) de la emisión de metano asintótico ( $\text{CH}_4$ ). En contradicción, los aditivos no revelaron ninguna influencia ( $P > 0,05$ ) en el tiempo asintótico, de tasa y de retardo de las producciones de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e hidrógeno ( $\text{H}_2$ ). El pH de la fermentación no se vio afectado ( $P > 0,05$ ), mientras que la digestión de materia seca (DMS) aumentó significativamente ( $P > 0.05$ ) debido a la suplementación de aditivos. Además, los aditivos disminuyen la producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada y mL/0.5 g materia seca degradada) hasta 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  $\text{CH}_4$  (mL/0.5 g materia seca incubada y mL/0.5 g materia seca degradada). Tanto los aceites como *S. cerevisiae* mostraron una influencia no significativa ( $P > 0.05$ ) en la emisión de  $\text{CO}_2$  (mL/0.5 g materia seca incubada), mientras que la emisión de  $\text{CO}_2$  (mL/0,5 g de materia seca degradada) se redujo significativamente ( $P \leq 0,05$ ) debido al tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* y el nivel de aceite  $\times$  interacciones. Del mismo modo, el tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* interacción reveló significativa ( $P < 0.05$ ) mitigación en la producción de  $\text{H}_2$  (mL/0.5 g materia seca degradada) hasta 12 h de incubación. Los aceites dietéticos y la levadura pueden ser implícitas como estrategia de manipulación dietética para mitigar *in vitro* las emisiones  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , y  $\text{H}_2$  de los caballos. La combinación de aceite de cártamo, aceite de pescado y levadura podría ser innegablemente un enfoque de alimentación prominente para los caballos hacia el mantenimiento de ecosistemas más limpios.

**Palabras clave:** gases; aceites dietéticos; caballo; mitigación; levadura.

“INCLUSIÓN DE ACEITE DE CÁRTAMO Y DE PESCADO EN COMBINACIÓN CON LEVADURAS, PARA LA DIETA DE EQUINOS Y SU IMPACTO SOBRE LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO (*in vitro*).”

# INDICE

DEDICATORIA .....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN .....	3
I. INTRODUCCION.....	9
II. REVISION DE LITERATURA .....	12
2.1 Aparato digestivo en equinos .....	13
2.2 Propiedades nutricionales de los forrajes y concentrados.....	16
2.3 Metabolismo del caballo con dietas altas en grasa.....	18
2.4 Efectos de la suplementación de levaduras en caballos.....	18
2.5 Emisión de gases de efecto invernadero .....	20
2.6 Producción de gas <i>in vitro</i> .....	21
2.7 Medición de la presión del gas .....	22
2.8 Preparación para la inoculación .....	22
2.9 Secado de las muestras .....	22
2.10 Molienda de los sustratos .....	22
2.11 Preparación del medio .....	23
2.12 Obtención del inóculo .....	23
2.13 Preparación del inóculo .....	23
2.14 Blancos.....	23
2.15 Método de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	23
2.16 Cinética de fermentación <i>in vitro</i> .....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	26
IV. HIPOTESIS.....	27
V. OBJETIVOS .....	28
5.1 Objetivo general .....	28
5.2 Objetivos específicos .....	28
VI. MATERIALES .....	29
6.1 Material biológico .....	29

<b>6.2 Extracción de contenido cecal de los caballos donantes</b> .....	29
<b>6.3 Material de laboratorio</b> .....	29
<b>6.4 Equipo</b> .....	29
<b>6.5 Reactivo y sustancias</b> .....	30
<b>6.6 Equipo de seguridad personal</b> .....	31
<b>VII. METODO</b> .....	32
<b>7.1 Preparación de variables</b> .....	37
<b>7.2 Tratamientos y diseño experimental</b> .....	38
<b>7.3 Cálculo y análisis estadístico</b> .....	40
<b>VIII. LÍMITE DE ESPACIO</b> .....	41
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	42
<b>X. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>XI. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>XII. LITERATURA CITADA.</b> .....	61

## INDICE DE CUADROS

1. Niveles de inclusión de aceite de cartamo, de pescado y <i>S. cerevisiae</i> .....	38
2. Alimentos utilizados en los tratamientos .....	38
3. Ingredientes de las dietas y niveles de inclusión de aceite .....	39
4. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para raciones en el gas fecal total <i>in vitro</i> y la cinética de CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> .....	43
5. Efectos de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para raciones en los parámetros de fermentación fecal <i>in vitro</i> , así como el GP total en diferentes períodos de incubación.....	47
6. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para raciones en la producción de CH <sub>4</sub> fecal <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación .....	50
7. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para raciones en la producción de CO <sub>2</sub> fecal <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación .....	53
8. Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con <i>S. cerevisiae</i> como aditivos para raciones en la producción de H <sub>2</sub> fecales <i>in vitro</i> en diferentes períodos de incubación .....	56

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Representación del aparato digestivo del equino .....	13
Fig. 2 Digestión y absorción de carbohidratos en monogástricos.....	15
Fig. 3 Pesaje de muestras .....	32
Fig. 4 Filtración de heces.....	33
Fig. 5 Preparación de soluciones .....	33
Fig. 6 Colocación de sustrato y solución nutritiva para procedimiento <i>in vitro</i> .....	34
Fig. 7 Frascos en incubadora 39°C .....	34
Fig. 8 Medición de producción de gas total .....	35
Fig. 9 Medición de CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> con MONITOR de calidad del aire YesAIR.....	35
Fig. 10 Medición de pH.....	36
Fig. 11 Filtración de sustrato .....	36
Fig. 12 Pesaje de muestras después del sacado .....	37
Fig. 13 Producción de gas fecal total de caballo (mL/0.5 g materia seca) en diferentes períodos de incubación por la inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y <i>S. cerevisiae</i> (SC) .....	44
Fig. 14 Producción de CH <sub>4</sub> fecal de caballo (mL/0.5 g materia seca) en diferentes períodos de incubación afectados por la inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y <i>S. cerevisiae</i> (SC).....	48
Fig. 15 Producción de CO <sub>2</sub> fecal de caballo (mL/0.5 g materia seca) en diferentes períodos de incubación afectados por la inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y <i>S. cerevisiae</i> (SC).....	51
Fig. 16 Producción de H <sub>2</sub> en heces de caballo (mL/0,5 g materia seca) en diferentes períodos de incubación afectados por la inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y <i>S. cerevisiae</i> (SC) .....	54

## I. INTRODUCCION

Los caballos han tenido una gran trascendencia durante la historia junto al hombre, en la antigüedad era uno de los pocos, por no decir que único, medio de transporte y de carga que ayudaba a facilitar el trabajo del hombre, además de que también se utilizó para la guerra. A medida que el mundo fue evolucionando y el avance tecnológico se hizo cada vez más evidente y así poder dar respuesta a las crecientes demandas de la sociedad, esta herramienta, fue perdiendo su implementación como animal de trabajo, y llegamos a un punto que en la actualidad es un animal más usado para actividades deportivas y recreativas que como animal de carga o tracción, sin embargo nuestro país aún hay zonas donde el acceso es limitado y se sigue utilizando al caballo para estos fines (Bonilla, 2013).

Las necesidades energéticas de los caballos con trabajo de alto rendimiento pueden duplicar a las necesidades del caballo en reposo, sin embargo las raciones altas en cereales suponen un riesgo de salud (cólico, laminitis) para el caballo debido a su limitada capacidad digestiva y metabólica para asimilarlos (Bajón *et al.*, 2013).

El aparato digestivo podemos describirlo como un tubo músculo-membranoso que se extiende de la boca al ano. En la parte anterior del aparato digestivo, la producción de grandes cantidades de saliva (1.5-3.0L/ MS consumida) esto es importante ya que ayudan a facilitar el paso del alimento a través del esófago y así llegar al estómago (Cunha, 1991). Posteriormente la ingesta ácida proveniente del estómago pasa a duodeno, aquí el pH se neutraliza a 7.0-7.4 por la bilis y las grasas se emulsionan para así dar paso al intestino grueso. El gran desarrollo del intestino grueso de esta especie le permite obtener energía en forma de ácidos grasos volátiles mediante la fermentación microbiana de la fibra (Pagan, 1998).

Los alimentos que disponemos para los caballos contienen elementos estructurales necesarios para la correcta nutrición de estos, pero estos se encuentran representados en distintas proporciones. El alimento es la suma de varios elementos, para una alimentación equilibrada, se debe empezar por conocer que ingredientes hay en la comida que consume el caballo. De esta manera se puede seleccionar el tipo, la calidad y cantidad de ración que se le dará al caballo (Bajón *et al.*, 2013).

Los caballos pueden usar grandes cantidades de forraje para satisfacer sus requerimientos nutricionales (Brandi, 2009). Sin embargo, las dietas con altas proporciones de granos se utilizan para maximizar la productividad (Oliveira, 2002). En la actualidad, las investigaciones buscan ingredientes alternativos que puedan reemplazar a los ingredientes tradicionales como el maíz, la harina de soya y el salvado de trigo por el uso de ingredientes alternativos, las fibras de fácil fermentación, o “superfibras”, parecen ser especialmente prometedoras (Furtado, 2011).

Hablando de alimentos compuestos, el rango de insumos que se utilizan es bastante amplio lo que conlleva a un gran interés por parte de la industria de alimentos balanceados a encontrar nuevas alternativas en la alimentación del caballo.

La manera en que se clasifica los alimentos, puede depender de lo que estos aporten a la dieta, ya sea un alto nivel de proteína o energía. El sistema internacional de identificación de alimentos, clasifica a los insumos de la siguiente manera (Shimada, 2009).

- 1- Forraje seco.
- 2- Pastura y pastizales.
- 3- Forraje ensilado.
- 4- Concentrados altos en energía.
- 5- Fuentes proteicas.
- 6- Minerales.
- 7- Vitaminas.
- 8- Aditivos.

La clasificación debe ser basada en las propiedades y el contenido nutricional del alimento (ricos en proteína, ricos en grasa, de rápida fermentación, ricos en carbohidratos, ricos en fibra). En la práctica de alimentación la clasificación se basa en los alimentos mayormente utilizados, como son los forrajes y concentrados balanceados. (Shimada, 2009).

El forraje debe ser lo principal en la dieta de los caballos ya que este proporciona energía y nutrientes esenciales, además de que promueve la motilidad intestinal y mantiene a la flora equilibrada, asimismo este participa en los procesos de fermentación (Bajón, 2013).

También se debe tomar en cuenta la buena relación simbiótica que existe con los microorganismos del aparato digestivo del caballo, así como la producción de energía dejando residuos en forma de ácidos grasos volátiles. Esto nos lleva a decir que es posible cubrir los requerimientos energéticos en la mayoría de los caballos solo con dietas a base de forrajes (NRC, 2007). Sin embargo las prácticas más comunes en la alimentación de caballos que practiquen cualquier deporte, es la suplementación de una parte de la dieta con forraje y otra con un concentrado generalmente elaborado a base de cereales (Gallagher *et al.*, 1992, Richards *et al.*, 2006).

El concentrado es incluido en dietas para caballos atletas para incrementar la densidad energética y de esta manera poder llegar a cubrir los requerimientos energéticos. Para el caso de las fuentes de fibra se tienen varias alternativas, sin embargo los más utilizados en la actualidad son los forrajes achicalados y la paja, en diferentes composiciones botánicas (pastos, leguminosas). (NRC, 2007, Nehra *et al.* 2005).

Los forrajes son una fuente de energía que frecuentemente se subestima en la nutrición del caballo. Los caballos tienen un colón muy desarrollado con una amplia microbiota que es capaz

de fermentar grandes cantidades de fibra de las plantas. Los ácidos grasos volátiles, el producto final de la fermentación de la fibra son absorbidos desde el colon y transportados al hígado. Cuando llegan a hígado los ácidos grasos volátiles pueden ser aprovechados como glucosa aunque también se pueden almacenar en hígado como glucógeno o incluso ser transformados en grasa y así formar parte del tejido adiposo. La fibra al ser digerida se usa como fuente de energía ya que la fermentación de esta produce AGV y estos están disponibles por largo tiempo luego de la comida. La salud intestinal de un caballo es crítica para el éxito. Normalmente el tracto digestivo del caballo está activo moviendo los ingredientes de las comidas por todo el largo del tracto (Mersales, 2017).

Los aceites son una fuente de energía muy importante, por su gran aporte de calorías en un volumen reducido. La fuente más comunes y económica son los aceites vegetales. De los distintos aceites vegetales, el de maíz es de más fácil digestión (Bajón, 2013).

La inclusión de distintas proporciones de grasa en la dieta de los caballos, ha sido objeto de mucha investigación. La mayoría de las raciones para caballos contienen del 3-5 % de grasa. Estudios recientes han demostrado que el típico equino adulto y de trabajo pueden tolerar hasta un 12 % de grasa en su dieta sin efectos perjudiciales. La grasa en la alimentación del equino es importante, ya que proporciona 2.25 veces más energía que igual peso de carbohidratos y proteínas (Venter, *et al.*, 2007).

La adaptación a dietas grasas afecta a la selección del sustrato a utilizar durante el ejercicio, se observa una mayor oxidación de lípidos con dietas grasas y una reducción del uso total de hidratos de carbono para la producción de energía durante el ejercicio de baja intensidad (aeróbico), así una disminución desde el 60 al 45 % en la contribución total a la producción de energía por los hidratos de carbono ha sido descrita por (*Pagan et al.*, 1998).

Algunas de las ventajas de la utilización de aceites en la alimentación de los caballos de deportes son: el aumento de la densidad energética de la ración y la disminución del volumen de alimento necesario para alimentar al caballo (*Potter et al.*, 1992); se puede reducir la cantidad de hidratos de carbono que reduce el riesgo de problemas de fermentaciones en el intestino grueso (cólicos, laminitis), el ahorro de glucógeno del músculo, la disminución del ácido láctico producido durante el esfuerzo aeróbico (baja intensidad de trabajo) y por tanto retraso en la aparición de la fatiga (*Greiwe et al.*, 1989).

Los estudios recientes en nutrición de equinos se han concentrado en disminuir los riesgos que se asocian con una alimentación alta en granos, con el fin de mitigar estos efectos se han administrado probióticos como aditivos en la dieta y han demostrado mejorar el equilibrio intestinal y la salud digestiva de los caballos (*Elghandour*, 2018).

El uso de aditivos de origen natural, en especial de las levaduras activas o vivas y de productos derivados de ellos como minerales en levadura, paredes celulares (Oligosacáridos y  $\beta$ -glucanos), en los últimos años han tomado importancia por los resultados positivos obtenidos

de evaluaciones específicas para cada especie productiva. Lo anterior conlleva a una mejor salud del animal, maximiza los procesos de digestión e incrementa la utilización de los nutrientes, así como una mayor producción de energía y síntesis de proteína y hasta una reducción en el uso de antibióticos (Ramírez, 2008).

En los equinos la suma de estos factores favorece la salud del caballo, la condición corporal, reduce trastornos de tipo metabólico como gastritis, cólicos y laminitis, y en consecuencia el aspecto físico y semblante del caballo luce de mejor manera para poder expresar su potencial al máximo (Ramírez, 2008).

Por su parte los gases de efecto invernadero reciben su nombre porque, de manera semejante en que las paredes de vidrio elevan la temperatura interior de los invernaderos, conducen al aumento de la temperatura de la superficie de la tierra al interactuar con la energía que proviene del Sol. Aunque la manera de atrapar el calor de un invernadero es fundamentalmente diferente a como funcionan los gases de efecto invernadero, la analogía ha perdurado y a su efecto se le denomina efecto invernadero (Bulege, 2013). Los principales gases responsables del efecto invernadero natural son:

- El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) generado a partir de la respiración de los seres vivos, la descomposición de la materia orgánica muerta y los incendios naturales.
- Vapor de agua
- El metano ( $\text{CH}_4$ ) emitido por los humedales y los rumiantes durante su proceso digestivo.
- El óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) producido por la descomposición bacteriana de la materia orgánica.
- El ozono ( $\text{O}_3$ ) cuando resulta de la unión natural de tres átomos de oxígeno.

Sin embargo, a partir de la era industrial, las actividades humanas han añadido una mayor cantidad de gases de efecto invernadero a la atmósfera, principalmente por la quema de combustibles fósiles y el cambio de uso de suelo o deforestación (Bulege, 2013).

## II. REVISION DE LITERATURA

Los caballos son una especie perteneciente al reino animal y forman parte de la familia *Equidae*. Se le conoce con el nombre científico de *Equus caballus* (Bonilla, 2013).

El manejo nutricional del caballo debe ser el adecuado en cada una de sus etapas fisiológicas tales como crecimiento, mantenimiento, reproducción y para un adecuado desempeño en la función zotécnica para la cual está destinado (Bonilla, 2013).

### 2.1 Aparato digestivo en equinos

El caballo es un herbívoro con un aparato digestivo que tiene características especiales como lo son: un estómago de poco volumen y un ciego e intestino muy desarrollado (Pérez de Ayala, 1995).

Está compuesto de dos secciones bien definidas un tracto anterior compuesto por boca, esófago, estómago e intestino delgado y un tracto posterior compuesto por el ciego, colon mayor, colon menor y el recto (Venter, 2007).

Fig. 1: Representación del aparato digestivo del equino (modificado de Bonilla, 2013).



El caballo es un animal monogástrico con un estomago pequeño, en donde la mayor parte de la comida es degradada en el ciego y el colon. Una gran cantidad de saliva es producida para facilitar el tránsito del bolo alimenticio, además la saliva actúa 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 3 horas en la parte inferior del estómago (Pilliner, 1993).

El estómago de los caballos es de aproximadamente 10-16 litros de capacidad. La digestión que se lleva en esta parte es una predigestión y es muy limitada para el resto de los componentes de la dieta como los carbohidratos y nula en lípidos y minerales (Pérez de Ayala, 1995).

Como producto del proceso de digestión de carbohidratos se obtiene ácido láctico y el nivel del pH disminuye a 2.6 en el estómago. Llegando al duodeno el alimento proveniente del estómago es muy ácido y es neutralizado por la bilis producida en el hígado (Frape, 2010).

El intestino delgado es de (16-24m) y la velocidad de tránsito es rápido de (1-2h) y lo componen el Duodeno, Yeyuno e Íleon, en este se digieren los azúcares, almidones, los lípidos y la fracción nitrogenada, los minerales también se absorben en este tramo a excepción del fósforo, absorbido principalmente por el colon. (Venter, 2007)

Aquí se lleva a cabo la digestión de los azúcares, almidones, lípidos y la fracción nitrogenada. La digestión enzimática en el intestino delgado aumenta en relación a la cantidad de concentrado que tiene la ración. Los minerales también se absorben en el intestino delgado a excepción del fósforo, ya que este se absorbe principalmente a nivel de colon. (Pagan, 1998).

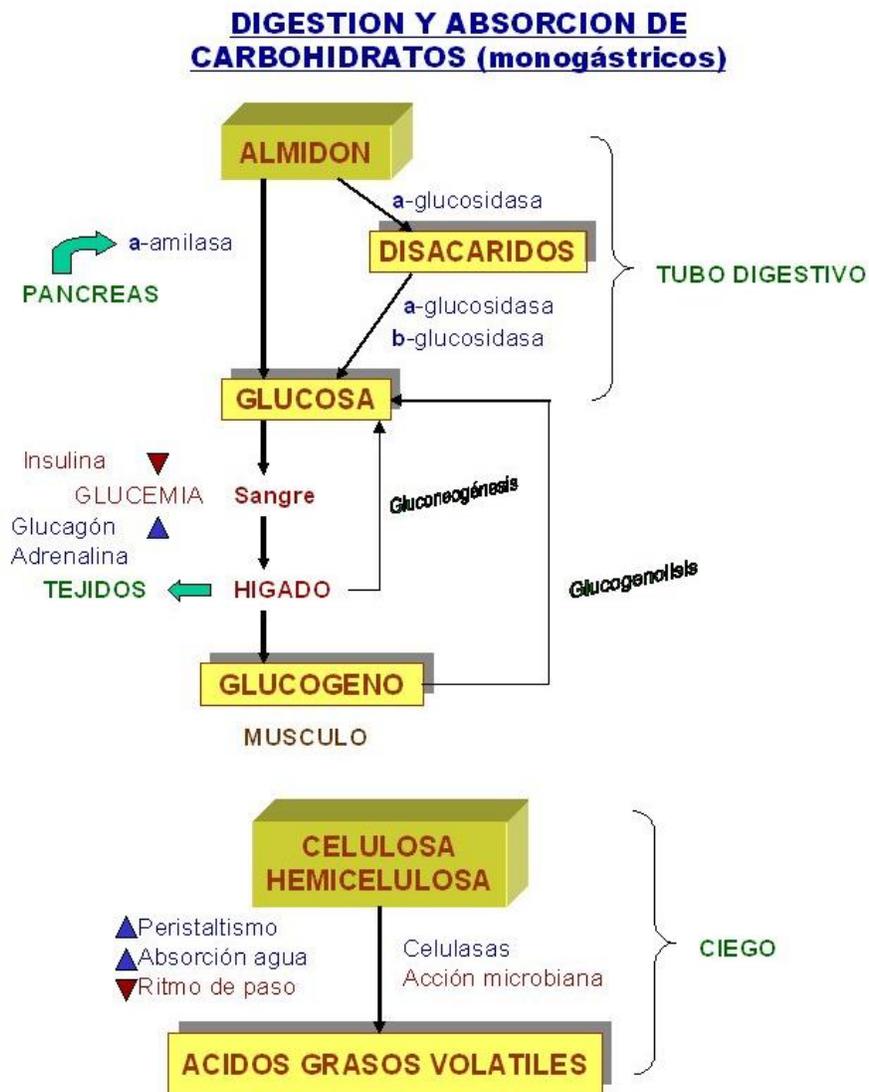
El pH del ciego y del colon tiene las condiciones ideales para el correcto funcionamiento de las bacterias anaeróbicas. Dentro del colon y ciego se presenta la fermentación de carbohidratos complejos, así como la síntesis de aminoácidos esenciales y de algunas vitaminas (Pagan, 1998). El colon es muy voluminoso con una capacidad de (180-220l) siendo su velocidad de tránsito de (24 a 48h), se estima que puede haber síntesis proteica con alguna absorción de aminoácidos, siendo su principal actuación como si fuera una gran cuba de fermentación para los organismos microbianos que allí habitan, sino se les proporcionará fibra a estos organismos, morirían descargando toxinas en el cuerpo del caballo. (Venter, 2007)

El intestino grueso está diseñado para utilizar la fibra de las plantas. Los carbohidratos insolubles, tales como la celulosa y la hemicelulosa de los forrajes, así como el almidón y otros carbohidratos solubles que no fueron digeridos en el intestino delgado. Cuando el alimento sale del intestino delgado entra en el ciego. Aquí es donde los nutrientes no digeridos tienen un proceso de fermentación similar al que ocurre en el rumen de los rumiantes. Después de la fermentación, el alimento va al colon para que ahí continúe el proceso de digestión y absorción (Cunningham, 2007).

La fermentación microbiana que se lleva a cabo en el intestino grueso da lugar a la producción de ácidos grasos volátiles que son una fuente importante de nutrientes para el caballo. El intestino grueso también sirve como un reservorio de agua y electrolitos que son vitales para mantener el rendimiento durante el ejercicio (Mersales, 2017).

Las funciones del intestino grueso son similares a las del rumen: guardar las condiciones favorables para mantener una fermentación óptima, lo que incluye el aporte de sustrato, el control de pH, la osmolaridad, la anaerobiosis, retención del material fermentante y una evacuación óptima de desechos producidos durante la fermentación (Cunningham, 2007).

Fig. 2: Digestión y absorción de carbohidratos en monogástricos (modificado de Biddle *et. al.*, 2013).



Cuando se tiene un alimento rico 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 AGV y la producción de ácido láctico, lo que genera una baja considerable del pH. La disminución del pH puede llevar al caballo a un estado de acidosis o incluso generarle un síndrome abdominal agudo (SAA) (Biddle *et al*, 2013).

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, su estado de salud y la etapa fisiológica en la que se encuentre. 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 (Rossister, 2008).

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 AGV's y glicerol en el intestino delgado y posteriormente son absorbidos (Cunha, 1991). Si se exceden los niveles de grasa pueden reducir la fermentación y la digestibilidad de la fibra.

## **2.2 Propiedades nutricionales de los forrajes y concentrados**

### **Forraje**

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 del mismo al tiempo que fue realizada la cosecha. El contenido celular es altamente digestible (80 – 100%) mientras que la verdadera digestibilidad de las paredes celulares es menor (40 – 50%) (Fonnesbeck, 1969).

Los carbohidratos en las plantas se presentan en forma de monosacáridos, disacáridos, almidones, celulosa y lignina. Las enzimas digestivas en los animales no pueden digerir la celulosa y la lignina, pero en el caso de los herbívoros, como las vacas y caballos; en el tracto digestivo los microorganismos funcionan para la descomposición y digestión de los alimentos (Shimada, 2009).

Clasificación de los carbohidratos:

Monosacáridos o azúcares sencillos (glucosa, fructosa, galactosa y manosa).

Oligosacáridos o disacáridos: contienen de dos a ocho unidades de azúcares (sacarosa, lactosa, maltosa, isomaltosa, trehalosa y celobiosa).

Polisacáridos: contienen gran cantidad de azúcares sencillos (almidón, glucógeno, celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina).

### **Cereales**

La composición de proteína, grasa y carbohidratos puede variar considerablemente según sean las fuentes de cereales.

Tomando como ejemplo alimentos que se utilizan en la dieta de equinos el contenido proteico es en orden descendiente el grano de maíz, avena y cebada. Sin embargo, la calidad de la proteína es mayor para el grano de avena y cebada, que para el maíz (Degussa, 1996).

Los carbohidratos se descomponen por las enzimas digestivas como la amilasa y finalmente se convierten en monosacáridos como la glucosa, absorbiéndose de esta forma en el intestino delgado. La glucosa se utiliza para brindar energía a las células. El exceso de glucosa se almacena en el músculo y en el hígado en forma de glucógeno, o se almacena en las células de grasa de los órganos internos y la piel sintetizándose en triglicéridos (Shimada, 2009).

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, la cebada 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 SAA, úlceras gástricas y laminitis (Beyer, 1998). Para la porción de fibra el grano de avena es el de mayor contenido, seguido de la cebada y maíz (Lindberg, 2006).

### **Alimentos proteicos**

Los alimentos que contienen más de un 20% de proteína se clasifican como suplementos proteicos (Shimada, 2009).

Las proteínas son los componentes de la mayor parte de las células del organismo, son de alguna manera los “ladrillos” que constituyen el cuerpo. Las proteínas a su vez están compuestas de unas estructuras menores llamadas aminoácidos, existen 22 tipos y sus diferentes combinaciones hacen posible la formación de distintas proteínas (Bonilla, 2013).

Estos aminoácidos pueden ser: esenciales (deben estar incluidos en la dieta pues el caballo no es capaz de producirlos sólo) y no esenciales (el organismo es capaz de crearlos por sí sólo). En cuanto a la cantidad de proteína que necesita un caballo depende de varios factores, como la calidad de la proteína administrada, así como de su edad, condición física, estado de actividad. (Bonilla, 2013).

El exceso de proteínas en la dieta sólo sirve para proporcionar energía, pero desde el punto de vista metabólico esta no es una buena fuente de energía, además es bastante cara y el exceso de energía es eliminado por vía urinaria (Lindberg, 2006).

### **2.3 Metabolismo del caballo con dietas altas en grasa**

En los animales monogástricos los lípidos se descomponen en ácidos grasos y glicerol por la lipasa secretada por la vesícula biliar y se absorben en el intestino delgado. Los ácidos grasos y glicerol absorbidos se sintetizan en triglicéridos en la pared del intestino delgado, se transportan por la sangre a las partes del cuerpo y se utiliza como energía. El exceso de triglicéridos se sintetiza en la grasa corporal. La energía de la grasa en comparación con otros nutrientes representa 2.25 veces de la cantidad de calor (Greiwe *et al.*, 1989).

La mayor parte del metabolismo se lleva a cabo en el intestino grueso produciendo ácidos grasos volátiles como acético, propiónico y butírico. Solo una pequeña fracción se metaboliza en el intestino delgado por acción directa de la lipasa y bilis (Shimada, 2009).

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 algunas enzimas (carnitina palmitiltransferasa, citrato sintetasa) que son altamente oxidativos (Geelen *et al.*, 2001).

### **2.4 Efectos de la suplementación de levaduras en caballos**

Los caballos tienen una limitada capacidad para digerir las grandes cantidades de almidón contenidas en los granos y de manera común cierta cantidad de almidón, que llega a nivel de intestino delgado no es digestible en su totalidad, Potter *et al.*, (1992).

Una de las estrategias nutricionales con mayor eficacia para contrarrestar dichos problemas ha sido el uso de levaduras vivas *S. 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.

Con la suplementación de levaduras en el proceso de digestión y la población microbiana del caballo 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). Además hay una conservación del pH, generando un ambiente con las características necesarias para la actividad microbiana (Jouany *et al.*, 2008).

### **Características generales de levadura *Saccharomyces cerevisiae***

La levadura es un hongo microscópico (organismo unicelular del reino fungi) 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. La propagación de las levaduras es un proceso mediante el cual la levadura convierte al oxígeno y al azúcar por medio del metabolismo oxidativo (García, 2001).

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, Triptófano, entre otros). Los principales productos utilizados comercialmente en la alimentación animal, provienen de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae* (García, 2001).

### **Tipos de levadura**

Las descripciones más acordes y afines a producción animal sobre los tipos de levaduras corresponden a las realizadas por García (2007), siendo las siguientes:

**Levadura inactiva o muerta:** Comprende una mezcla física de granos de fermentación y levadura viva no presentar viabilidad, finalidad proporcionar péptidos al rumen.

**Levadura activa o viva:** Es un producto compuesto tanto de levadura viva como de productos de fermentación, tiene una alta viabilidad. Con la factibilidad de cambiar el tipo y número de microorganismos presentes, a manera de mejorar el patrón de fermentación.

**Levadura mineralizada:** Por medio de la fermentación se obtiene un producto, en este caso una levadura que es sometida a un medio alto de un determinado mineral de interés, mediante este proceso la levadura absorbe el mineral, dando como resultado un mineral ligado a una levadura.

**La levadura de cervecera:** (*Saccharomyces cerevisiae*) es un subproducto derivado de la producción de cerveza. Su principal función es aportar proteína de alta digestibilidad, un adecuado perfil de aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas del grupo B. (García, 2007)

### **Mecanismo de acción de una levadura en caballos**

A pesar de su sabor amargo, *Saccharomyces cerevisiae* tiene una elevada palatabilidad en todas las especies. El efecto de acción de *S. cerevisiae* en caballos es maximizar la digestibilidad, mejorar el patrón de fermentación a nivel del ciego, reducir la acumulación de ácido láctico (AL) e incrementar la síntesis tanto de energía como de proteína (Pagan, 1998).

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 celulíticas a nivel intestinal, esto incrementa la posibilidad de incidencia de cólicos, úlceras gástricas y laminitis (Kronfeld, 2005). 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 celulíticas e incrementa la digestibilidad de los nutrientes.

## **2.5 Emisión de gases de efecto invernadero**

Globalmente, la causa principal del incremento en las emisiones de éstos GEI son las actividades relacionadas con el sector energético que representan 26% de las emisiones, seguido del sector industrial (19%), forestal (17%), agrícola y ganadero (14%), residencial y comercial (8%) y de manejo de desechos (3%) (IPCC, 2013). Aunque las actividades agrícolas y ganaderas son la cuarta causa de emisiones de GEI, éste sector emite grandes cantidades de los llamados “gases que no son CO<sub>2</sub>” (Montzka *et al.*, 2011).

El vapor de agua es el GEI más abundante en la atmosfera siendo las nubes una parte importante de esto, también reflejan los rayos solares hacia la superficie del planeta sin embargo tienen un efecto refrigerante afectando a la temperatura del aire que a su vez afecta a la formación de nubes convirtiéndose en una relación circular complejo para su estudio en comparación con GEI como el CO<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub> son más investigados. Las actividades humanas no afectan directamente la concentración media global del vapor de agua, sin embargo, el incremento en la concentración de otros GEI puede afectar indirectamente el ciclo hidrológico. Una atmosfera más caliente tiende a incrementar su contenido de vapor de agua y con esto mayor formación de nubes (IPCC, 2013).

### **Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)**

El dióxido de carbono es uno de los gases traza más comunes e importantes GEI asociado a actividades humanas. En relación a las actividades humanas el CO<sub>2</sub> se emite principalmente, por el consumo de combustibles fósiles (carbón, petróleo y sus derivados y gas natural) y leña para generar energía, por la tala y quema de bosques (según la FAO, el 26% de la superficie terrestre se destina al pastoreo, y la producción de forrajes requiere de cerca de una tercera parte del total de la superficie agrícola. Las mayores concentraciones de CO<sub>2</sub> se presentan en el hemisferio norte, donde se encuentran los países industrializados responsables del aumento excesivo en la concentración de los GEI que se han ido acumulando en la atmosfera desde la revolución industrial a mediados del siglo XIX (IPCC, 2013).

## Metano (CH<sub>4</sub>)

Por otra parte el CH<sub>4</sub> es el gas “no CO<sub>2</sub>” más abundante en la atmósfera (Montzka *et al.*, 2011), tiene un potencial de calentamiento 28 veces mayor en comparación con el CO<sub>2</sub> y un tiempo de residencia en la atmósfera de 9 a 15 años (IPCC, 2013). El CH<sub>4</sub> es emitido por fuentes naturales como los humedales pero también por actividades humanas como fugas de los sistemas de gas natural y las crecientes actividades ganaderas (FAOSTAT, 2014).

Una fuente muy importante de metano son las actividades agrícolas relacionadas con fermentación entérica como consecuencia del proceso digestivo de los herbívoros; descomposición en condiciones anaerobias del estiércol generado en la ganadería. Otra fuente importante de metano está relacionada con la producción y distribución de gas natural y petróleo.

El efecto de las emisiones de metano por fermentación intestinal de los herbívoros (principalmente bovinos y equinos) es bastante grande a nivel global y se estima que de esta manera se pueden producir hasta el 37% del metano que se encuentra en la atmósfera (Montzka *et al.*, 2011).

Por ésta razón es importante monitorear e incluir las emisiones del sector agrícola y ganadero en las estrategias de mitigación, ya que remover gases como el N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> de la atmósfera podría tener un impacto mayor que remover la misma masa de CO<sub>2</sub> (Robertson, 2004).

### 2.6 Producción de gas *in vitro*

La técnica de producción de gas *in vitro* se ha utilizado para determinar el valor nutritivo de los forrajes. El principio fundamental de la técnica es la cantidad de gas liberado, cuando una muestra de alimento es incubada *in vitro* con líquido cecal, es directamente proporcional con la digestibilidad o la degradación del sustrato de la muestra y por lo tanto con el valor energético del alimento (Menke y Steingass, 1988).

Los métodos *in vitro* tienen la ventaja de utilizar un mayor número de alimentos y repeticiones de los mismos, además, el mantenimiento de las condiciones experimentales permite controlar una serie de factores extrínsecos (eliminar efecto animal) (Posada y Noguera, 2005).

La energía para el crecimiento microbiano deriva de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce AGV, succinato, generando, etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), y trazas de hidrógeno (H<sub>2</sub>); sin embargo, ellos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Opatpatanakit *et al.*, 2001). La producción de gas desde la fermentación de la proteína es relativamente pequeña (Makkar, 2001).

En la prueba de producción de gas *in vitro* usando tampón de bicarbonato, el CO<sub>2</sub> es también producido en la neutralización de los AGV generados (Pell y Schofield 1993). Para los forrajes,

cuando el tampón de bicarbonato es usado, alrededor del 50% del volumen total de gas producido tiene este origen, y puede aproximarse al 60% en dietas con alta proporción molar de propionato (Getachew *et al.*, 1998). El CO<sub>2</sub> producido desde el tampón puede encontrarse asumiendo que por cada mmol de AGV producido se libera 0.8-1.0 mmol de CO<sub>2</sub>, dependiendo de la cantidad de tampón de fosfato presente (Opatpatanakit *et al.*, 1994; Makkar 2001).

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 o cecal neutralizado (Opatpatanakit *et al.*, 2001).

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 (Getachew *et al.*, 1998).

### **2.7 Medición de la presión del gas**

La cinética de producción de gas puede medirse de una forma más precisa empleando transductores de presión y variantes del sistema descritos por Pell y Schofield (1993), Theodorou *et al.*, (1994), Davies *et al.*, (1995) y Cone *et al.*, (1996).

### **2.8 Preparación para la inoculación**

La técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos de digestibilidad usan sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo fecal (Williams, 2000).

### **2.9 Secado de las muestras**

El contenido y la naturaleza de varios constituyentes del alimento y por consiguiente, la cinética de fermentación, pueden ser influenciados por la temperatura y el proceso de secado del sustrato. La mayoría de los grupos hacen secado en el horno a baja temperatura (60 o 70°C) (Williams, 2000).

### **2.10 Molienda de los sustratos**

La cantidad de material requerido para evaluar la cinética de fermentación varía desde 0.1 a 1 g (Williams 2000). Con un aumento en el tamaño de la muestra se produce una disminución en la producción de gas por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento del tampón (Getachew *et al.*, 1998).

### **2.11 Preparación del medio**

Todos los medios en uso tienen en común tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y resazurina como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO<sub>2</sub> es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas. Esto a su vez indican que el gaseo continuo con CO<sub>2</sub> y los agentes reductores promueven un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la FDN (Williams 2000).

### **2.12 Obtención del inóculo**

El contenido cecal es tomado después del ayuno es menos activo que el colectado dos horas después de alimentar, pero es más consistente en su composición y actividad. Como regla general, se recomienda coleccionar el inóculo antes de la alimentación y de por lo menos tres animales consumiendo la misma dieta. (Williams 2000). La incubación de un mismo sustrato puede conducir a diferente producción de gas si el contenido cecal es tomado en diferentes días, situación que deberá corregirse por la introducción de estándares de conocida producción de gas (Getachew *et al.*, 1998).

### **2.13 Preparación del inóculo**

El licuado incrementa en el inóculo el número de bacterias previamente adheridas a la fibra, la mayoría celulolíticas, pero también el número de partículas pequeñas del alimento, por lo que la producción de gas en los frascos de incubación y en los blancos se hace mayor (Pell y Schofield 1993). El procedimiento de licuado puede también aumentar el riesgo de exposición al oxígeno si el flujo de CO<sub>2</sub> no es suficientemente fuerte (Williams 2000).

### **2.14 Blancos**

Una serie de botellas blanco conteniendo medio e inóculo, pero no sustrato, es rutinariamente incluida en cada corrida. El promedio de gas registrado por los blancos, que normalmente corresponde al 13-27% de la lectura final, es substraído desde el total de gas producido por los sustratos evaluados, obteniendo así el total de gas realmente derivado desde la fermentación del sustrato (Pell y Schofield 1993).

### **2.15 Método de digestibilidad *in vitro***

A través de los métodos *in vitro* se simulan las condiciones controladas, la fermentación que se produce en el ciego en las cuales se obtiene contenido fecal. Después de que se elimina la

mayor parte de partículas fecales, se coloca el líquido en un recipiente con una solución amortiguadora buffer (para simular la saliva) y la muestra de prueba. Continuamente se hace fermentar esta mezcla a 39 °C que es la temperatura del ciego en un lapso de tiempo determinado dependiendo del tipo de alimento (Church *et al.*, 2004).

Los métodos *in vitro* miden la fermentación microbiana de los alimentos a partir del volumen de gas *in vitro*. Debido a esto se necesita usar animales como donantes de inóculo, además de solución buffer, reactivos y equipo que garantice el pH, mantener un ambiente anaeróbico, óptima concentración microbiana de ingredientes esenciales para los microorganismos, con la finalidad de evitar todos aquellos factores que limiten la cinética de degradación cecal durante el tiempo que transcurra para la toma de datos necesarios (Vieyra y Martínez, 2001).

### **2.16 Cinética de fermentación *in vitro***

Expresiones cuantitativas de la cinética de digestión son necesarias para estimar de una forma más precisa la cantidad de nutrientes digeridos desde los alimentos y las propiedades intrínsecas de éstos que limitan su disponibilidad para los rumiantes (López *et al.*, 2008).

La cinética de producción de gas depende de las proporciones de partículas solubles, insolubles pero degradables, y no degradables del alimento (Getachew *et al.*, 1998). La sincronización entre la energía y el nitrógeno suplementados en el rumen es una aproximación para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal o del intestino grueso. Para aplicar este principio en formulación de alimentos, se necesitan datos sobre las tasas de degradación de las proteínas y de fermentación de los carbohidratos. Las técnicas de producción acumulativa de gas pueden ser usadas para generar esta información (Williams 2000). La producción de gas podría también ser potencialmente usada para comparar la cinética de fermentación desde el rumen o el intestino grueso de diferentes especies y/o del resultado de diferentes dietas (Williams *et al.*, 2000).

En resumen, la técnica Producción de gas *in vitro* fue descrita por Theodorou *et al.*, (1994) con base en un transductor (Druck Incorporated DPI 701 555 in H20/20 psi), para medir la presión generada por la producción de CO<sub>2</sub> y jeringas de plástico para medir el volumen de gas (milímetros).

La preparación del medio según Menke y Steingass (1988) consideró diversos componentes: Solución de Microminerales, Solución Buffer, Solución de Macrominerales, Solución Reductora, Cisteína, Indicador Anaerobio y Resazurina.

Para las mediciones por producción de gas *in vitro* se considera la producción acumulada *in vitro* de gas a 24 h y las variables de producción de gas de las especies arbóreas forrajeras en estudio. Para efecto de comparar los incrementos (%) en la producción de gas en las especies tratadas con respecto a las no tratadas a las 24 horas de incubación puede utilizar la siguiente fórmula: Incremento (%) = ((volumen de gas con tratamiento) - (volumen de gas sin tratamiento)) / (volumen de gas sin tratamiento) \* 100 (Williams *et al.*, 2000).

Para el procesamiento de los datos, por ejemplo: se toman los datos de los perfiles de producción de gas de 0 a 96 h se procesan con base en el modelo sin el tiempo de  $L$  (Theodorou *et al.*, 1994) para derivar las variables de degradación  $a$ ,  $b$  y  $c$ :

$$Y = a + b (1 - \exp(-ct))$$

Donde:

$Y$  = Producción de gas en el tiempo  $t$ .

$a$ ,  $b$  = Constantes de la ecuación.

$c$  = Tasa de producción del gas.

### III. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo se centra en evaluar la adición con aceite de cártamo y de pescado en combinación con *Saccharomyces cerevisiae* en dietas, como alternativas nutricionales para la alimentación de equinos como productos altos en energía y bajos en almidón para favorecer la salud de estos animales y así poder evitar ciertas enfermedades que los predisponen las dietas altas en granos, así mismo buscar soluciones que disminuyan la producción de gases de efecto invernadero relacionados con la fermentación cecal para reducir el calentamiento global.

## IV. HIPOTESIS

La inclusión de aceite vegetal (cártamo) y de pescado en conjunto con el aditivo *Saccharomyces cerevisiae*, mejora el aporte energético en la alimentación de caballos y disminuye la producción de gases de efecto invernadero.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de niveles diferentes de aceite de cártamo y pescado con o sin la adición de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la digestibilidad y producción de gases en caballos maduros con trabajo moderado.

### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar la digestibilidad de los Nutrientes (Materia Seca, Materia Orgánica) para cada uno de los niveles de inclusión de aceite y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Evaluar la estabilidad microbiana y el nivel de pH para cada uno de los niveles de inclusión.
- Determinar la producción de gas *in vitro* de los distintos niveles de inclusión utilizando diferentes fuentes de aceite.
- Analizar la producción de gas *in vitro* utilizando contenido fecal de las muestras adicionadas con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Medir la producción de gases de efecto invernadero en cada uno de los niveles de inclusión.

## VI. MATERIALES

### 6.1 Material biológico

Se utilizaron 4 caballos adultos del Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Estado de México, México (7 a 9 años de edad y un peso de  $490 \pm 20.1$  kg) Alimentados con 2 kg de alimento concentrado al día de marca comercial (Horse power®), heno de avena y agua *ad libitum*.

### 6.2 Extracción de contenido cecal de los caballos donantes

Antes de comenzar la incubación, se colectaron muestras fecales (la fuente de inóculo) directo del recto de los caballos en el Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Estado de México, México (En Toluca Estado de México, coordenadas 19°17'32"N 99°39'14"O).

Las muestras se conservaron en refrigeración.

### 6.3 Material de laboratorio

Vasos de precipitado de 250 ml

Vasos de precipitado de 500 ml

Pipetas de 1 ml

Pipetas de 5 ml

Probeta 120 ml

Probeta 25 ml

Gasas

Frascos de 100 ml con tapa de goma

Crisoles de vidrio

Agua destilada

### 6.4 Equipo

Monitor de calidad del aire YesAIR (crítica ambiental Technologies Canadá Inc., Delta, BC, V4G 1M3, Canadá)

Potenciómetro digital (Conductronic pH 15, Puebla, México).

Transductor de presión (Extech, Waltham, USA).

Molino

Estufa

Incubadora

Bascula

## **6.5 Reactivo y sustancias**

### **Solución buffer:**

35 g de bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ )

4 g de carbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

(Para aproximadamente 500 ml de agua destilada y luego hacer el volumen a 1 litro con agua destilada)

### **Solución macromineral:**

6.2 g de fosfato dihidrógeno potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),

5.7 g de hidrógeno fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.6 g de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

(Para aproximadamente 500 ml de agua destilada y luego hacer el volumen a 1 litro con destilación Agua)

### **Solución micromineral:**

10 g de cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

13.2 g de cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

1 g de cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

8 g de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

(Para aproximadamente 50 ml de agua destilada y luego realizar el volumen a 100 ml de agua destilada)

### **Resazorina:**

Resazorina 0.1 g en 100 ml de agua destilada.

### **Solución reductora:**

996 mg de sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )

Para 94 mL de agua destilada y luego añadir 6 ml de solución de hidróxido sódico 1 N (disolver 4 g de hidróxido sódico en 100 ml de agua destilada para 1 N de hidróxido sódico).

## **6.6 Equipo de seguridad personal**

Bata blanca

Guantes de látex

Guantes de palpación

Cubre bocas

## VII. METODO

La técnica de producción de gases es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento mediante del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou *et al.*, 1994). Una de las múltiples ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell *et al.*, 1997).

La técnica de producción de gas *in vitro* es una prueba que ha sido usada para la evaluación de alimento para ganado, principalmente porque pueden estimarse las tasas de fermentación vía acumulación de gas. Aunque los productos de desecho, gases fermentados (principalmente CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) representan parte del alimento que ha sido degradado (Posada y Noguera, 2005).

Procedimiento:

1. Se pesaron 0.5 g del sustrato de cada uno de los tratamientos para posteriormente mezclarlo con la solución nutritiva y el contenido cecal.



Fig. 3 Pesaje de muestras

2. Las heces que fueron recolectadas, se filtran en un vaso de precipitados con una capa de cuatro gasas, para separar la parte líquida de la parte sólida.



Fig. 4 Filtración de heces

3. Para la solución nutritiva se mezclaron; solución macromineral 850ml, solución buffer 850ml, resazurina 4ml, solución micromineral 0.4 ml y agua destilada 2000ml.



Fig. 5 Preparación de soluciones (de izquierda a derecha; solución buffer, solución macromineral, resazurina, solución micromineral, agua destilada, solución nutritiva final).

4. Posteriormente se colocaron los 0.5g MS de cada uno de los tratamientos en frascos individuales de 120 ml y se adiciono la solución nutritiva (40 ml), más líquido cecal (10 ml); además se utilizaron por triplicado blancos sin sustratos en el experimento.



Fig. 6 Colocación de sustrato y solución nutritiva en relación 1:4 con contenido cecal para procedimiento *in vitro*.

5. Los frascos se taparon herméticamente para después incubarse a 39°C en baño de inmersión durante el experimento.



Fig. 7 Frascos en incubadora 39° C

6. Se midió la producción de gas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas Theodorou (*et al*, 1994) usando el transductor de presión (Extech, Waltham, USA).

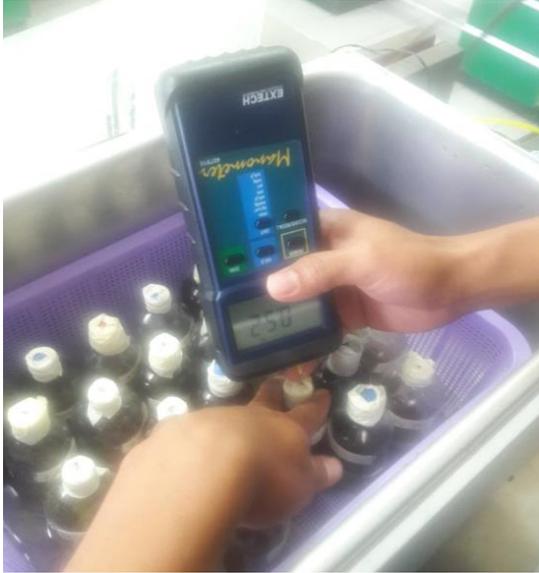


Fig. 8 Medición de producción de gas total

7. Además, el nivel de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  se estimó mediante el detector de gas (MONITOR de calidad del aire YesAIR, crítica ambiental Technologies Canadá Inc., Delta, BC, V4G 1M3, Canadá).



Fig. 9 Medición de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  con MONITOR de calidad del aire YesAIR

8. Las botellas fueron destapadas al finalizar el experimento y la medición del pH se llevó a cabo utilizando el medidor de pH (Conductronic pH15, Puebla, México).



Fig. 10 Medición de pH

9. El contenido de la botella se filtró a través de un filtro (porosidad gruesa no. 1 tamaño de poro 100-160  $\mu\text{m}$ ; Pyrex, Stone, UK).



Fig. 11 Filtración de sustrato.

10. La aparente degradabilidad de materia seca (DMS) se calculó después de secar los residuos durante la noche a 105 ° C.

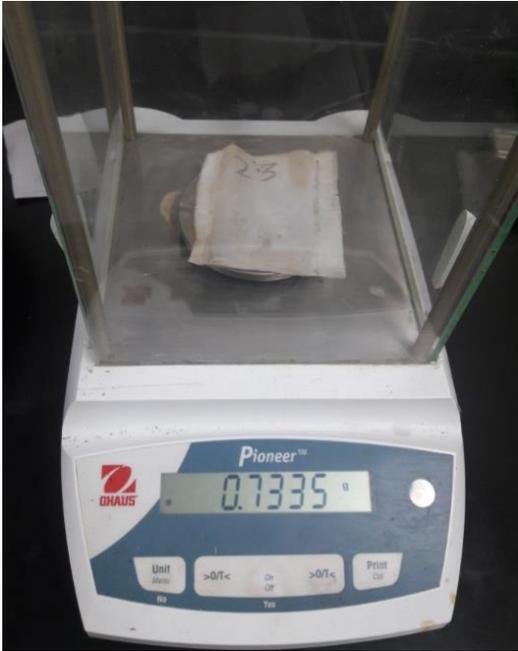


Fig. 12 Pesaje de muestras después del sacado

### 7.1 Preparación de variables

- Factores y niveles de estudio:

a) Aceite de cártamo (Ac) y de pescado (AP) 2.4 y 4.8% cada uno

b) Levadura *Saccharomyces cerevisiae* de Procreatin 7® (Safmex/Fermex S.A. de C.V., Toluca México) en forma de polvo que contiene  $1 \times 10^{10}$  células/g) 0 mg/g y 4 mg/g de MS.

## 7.2 Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos se definieron de acuerdo a las combinaciones de un diseño Factorial 3X2, obteniéndose los siguientes tratamientos:

Cuadro 1: Niveles de inclusión de aceite de cártamo, de pescado y *S. cerevisiae*.

TRATAMIENTOS		
ACEITE DE CÁRTAMO	ACEITE DE PESCADO	LEVADURA
2.4%	2.4%	0 mg/g
2.4%	2.4%	4 mg/g
4.8%	4.8%	0 mg/g
4.8%	4.8%	4 mg/g

Se utilizaron un total de 30 frascos (8 tratamientos × 3 repeticiones) más tres botellas sin sustrato y sin levadura y tres con levadura como blancos.

Cuadro 2: Alimentos utilizados en los tratamientos

Nombre común	Nombre científico
Cascara de soya	<i>Glycine max</i>
Maíz rolado	<i>Zea mays</i>
Pasta de soya	<i>Glycine max</i>
Cebada rolada	<i>Hordeum vulgare</i>
Avena	<i>Avena sativa</i>
Salvado de trigo	<i>Triticum aestivum</i>

Cuadro 3: Ingredientes de las dietas y niveles de inclusión de aceite.

	Control	Aceite de cártamo		Aceite de pescado	
		Bajo	Alto	Bajo	Alto
Ingredientes (%)					
Avena	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Maíz rolado	25.0	22.6	20.2	22.6	20.2
Cebada rolada	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Salvado de trigo	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Gluten de maíz	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Pasta de soya	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Nivel de aceite	0.0	2.4	4.8	2.4	4.8
Melaza	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Vit/Min	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cascarilla de soya	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
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

### 7.3 Cálculo y análisis estadístico

Los datos de cada una de las tres corridas, dentro de la misma muestra de cada una de las tres muestras individuales de la ración totalmente mezclada (RTM) fueron promediadas antes del análisis estadístico. Se utilizaron los valores medios de cada muestra individual como unidad experimental. Los resultados de la producción de gas *in vitro* y de los parámetros de la fermentación fecal serán analizados como un experimento con arreglo factorial de tratamientos utilizando el PROC GLM opción de SAS (2000) como:

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

Dónde:

$Y_{ijk}$  = es cada observación de la i-ésima RTM

$R_i$  = la j-ésima dosis de levadura

$A_j$  = el j-esimo nivel de aceite en dieta

$\mu$  = es la media general

$(R \times A)_{ij}$  = es la interacción entre el tipo de dieta y la dosis de levadura

$E_{ijk}$  = es el error experimental; Se observó un nivel significativo en  $P \leq 0,05$ .

Se utilizarón contrastes de polinomios ortogonales para examinar las respuestas (lineal y/o cuadrática) a los niveles de adición de la prueba (niveles de adición de aceite vegetal y dosis de levadura). La significancia estadística se declaró a  $P < 0.05$ . La comparación de medias se realizará con la prueba de Tukey.

Para calcular los parámetros de cinéticos de la producción de gas, los resultados de producción de gas (mL/g DM) fueron aptos según France *et. al.*, (2000) Ecuación:

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

Donde:

A = volumen de producción de gas en el tiempo t;

b = producción de gas asintótico (mL/g DM);

c = tasa de producción de gas (/h),

L (h) = tiempo de retardo discreto antes de la producción de gas.

### **VIII. LÍMITE DE ESPACIO**

Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (En Toluca Estado de México, coordenadas 19°17'32"N 99°39'14"O).

Los análisis químicos y de degradabilidad *in vitro* de los alimentos se realizaron en el laboratorio de bromatología del departamento de nutrición animal de la FMVZ-UAEM (En Toluca Estado de México).

Hospital Veterinario de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México (Toluca Estado de México).

## X. RESULTADOS

### Gas fecal total y cinética de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>

En la presente investigación se muestra en el Cuadro 4 el efecto de los aceites de cártamo y de pescado (con dos concentraciones diferentes) en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos en la dieta y su efecto en la producción de gases fecales totales *in vitro* y la cinética de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> de raciones mixtas totales para el proceso *in vitro*. La producción de gas asintótico, tasa de producción de gas, y período de retraso (*L*) no se vieron afectados ( $P > 0.05$ ) debido a la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado, y *S. cerevisiae*. El tipo de aceite y nivel de aceite, las interacciones del nivel de aceite y *S. cerevisiae* tampoco mostraron ningún impacto en la producción de gas asintótico, la tasa de producción de gas y el período de retraso. El nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* mostró una mitigación significativa ( $P = 0.047$ ) en las emisiones de CH<sub>4</sub> asintótica. La interacción entre el tipo de aceite y la *S. cerevisiae*, y el tipo de aceite y el nivel de aceite mostraron un impacto no significativo ( $P > 0.05$ ) en la tasa de emisión de CH<sub>4</sub>. Por otro lado, el aceite de cártamo y el aceite de pescado a 2,4 y 4,8% mostraron una influencia significativa ( $P = 0.035$ ) en el período de retraso de la producción de CH<sub>4</sub> (Cuadro 4). El tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae*, el nivel de aceite  $\times$  tipo de aceite, el nivel de aceite  $\times$  las interacciones de *S. cerevisiae* no mostraron ningún efecto sobre el tiempo de las producciones de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> *in vitro* (Cuadro 4).

Cuadro 4: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para raciones en el gas fecal total *in vitro* y la cinética de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

Tipo de aceite	Nivel de aceite	S C	Gas total			CH <sub>4</sub>			CO <sub>2</sub>			H <sub>2</sub>		
			B	C	L	B	C	L	B	C	L	B	C	L
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
Aceite de cártamo	Bajo	-	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
	Alto	-	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
Aceite de pescado	Bajo	-	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
	Alto	-	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
SEM <sup>2</sup>			33.03	0.0180	1.503	6.45	0.0752	2.966	20.91	0.0097	2.056	8.47	0.039	1.476
Efecto del aditivo <sup>3</sup> :														
Tipo de aceite (TA)			0.729	0.316	0.333	0.173	0.925	0.115	0.989	0.328	0.300	0.360	0.877	0.800
Nivel de aceite (NA)			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
TA × 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
TA × NA			0.770	0.714	0.418	0.238	0.989	0.626	0.638	0.312	0.140	0.500	0.950	0.450
NA × 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

<sup>1</sup> B es la producción de gas asintótico (mL/g de materia seca).

C es la tasa de producción de gas (/h).

L es el retardo inicial antes de que comience la producción de gas (h).

<sup>2</sup> SEM es el error estándar de la media.

<sup>3</sup> P El valor de la interacción entre tres factores experimentales no significativa ( $P > 0.05$ ).

0 = Sin aditivo, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, - = 0mg/g de materia seca, + = 4mg/g de materia seca, SC = *S. cerevisiae*.

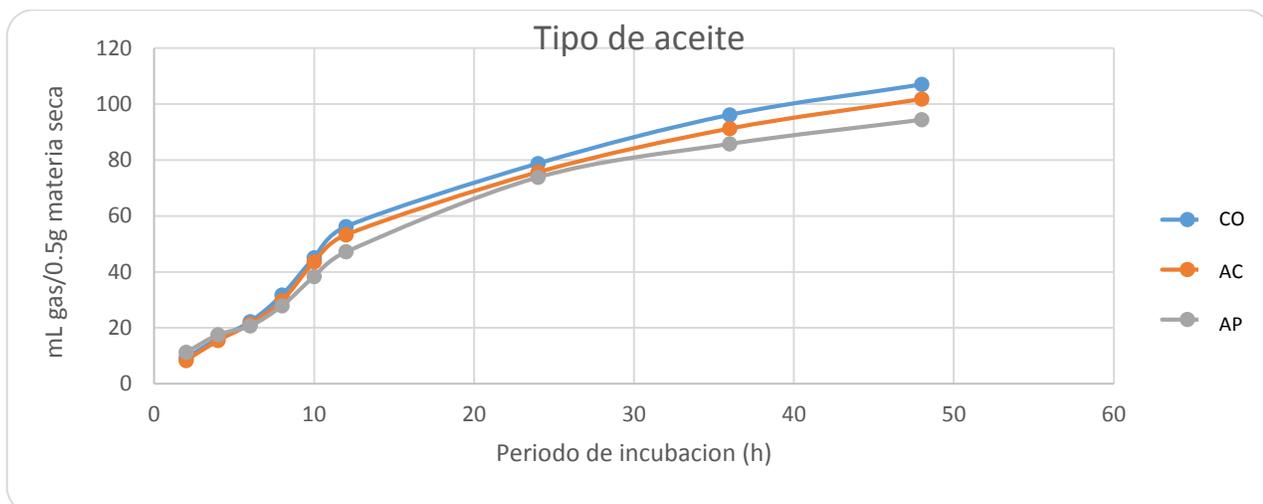
### Perfil de fermentación *in vitro* y producción de gas

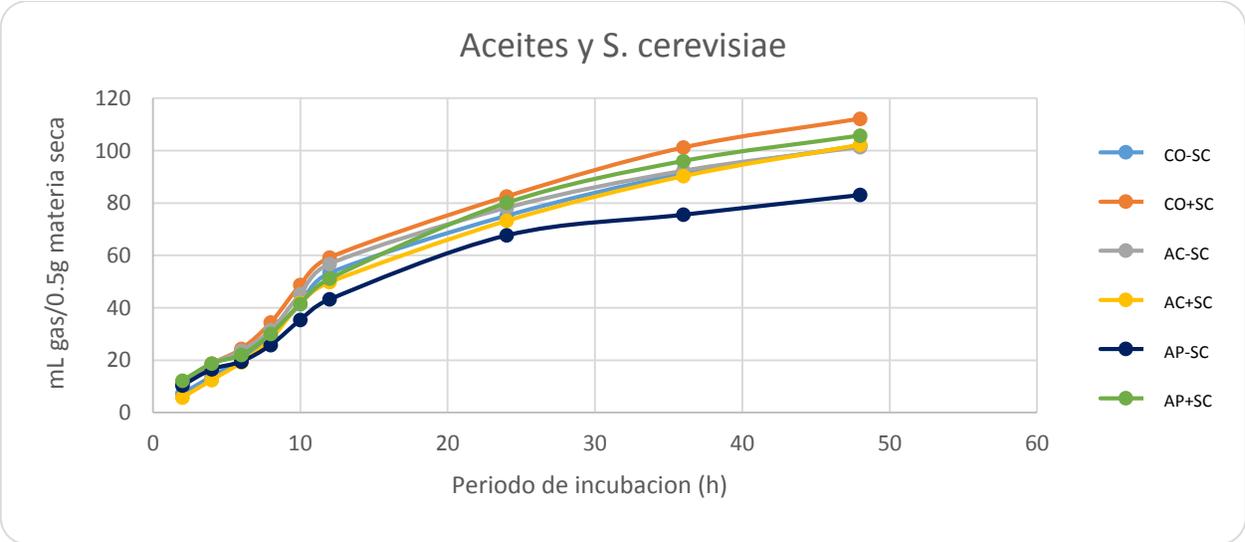
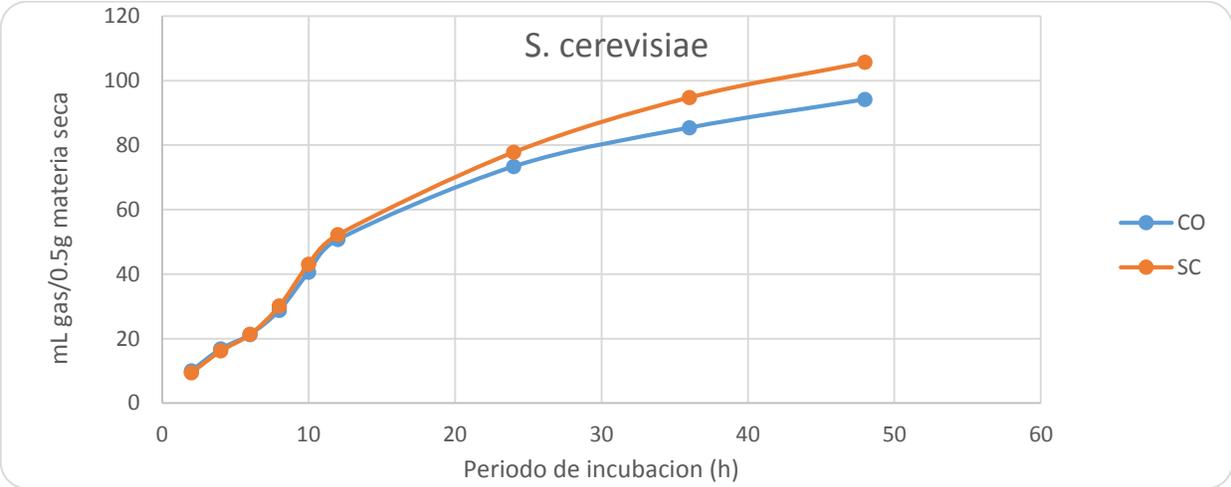
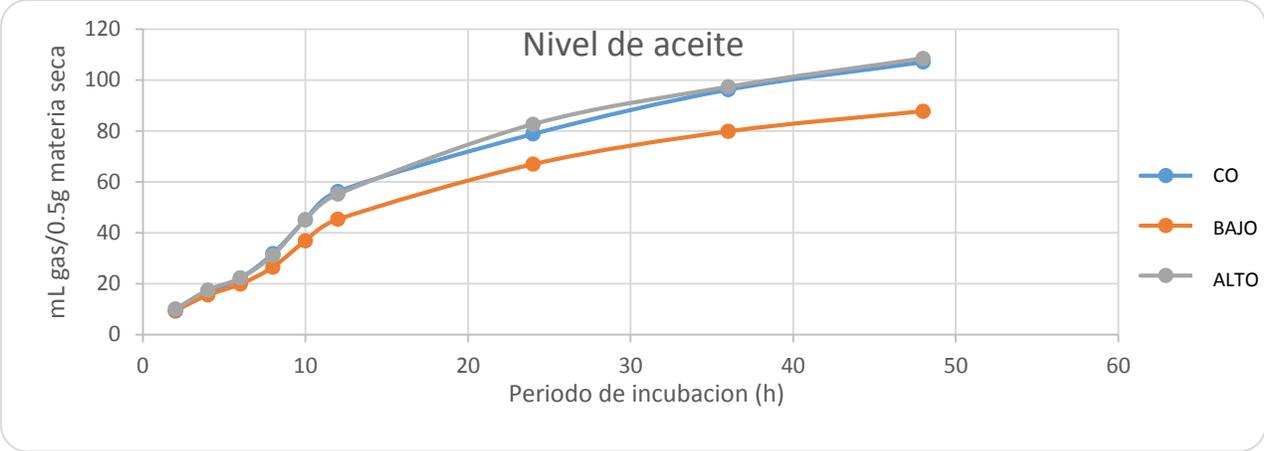
El pH de fermentación no se vio afectado ( $P > 0.05$ ) con la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae* en concentraciones distintas. El tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae*, el tipo de aceite  $\times$  el nivel de aceite, y las interacciones de *S. cerevisiae* tampoco mostraron ningún impacto ( $P > 0,05$ ) en el nivel de pH. Por el contrario, el tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae*, el tipo de aceite  $\times$  el nivel de aceite y las interacciones de nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* mostraron un aumento significativo ( $P > 0.05$ ) en la degradabilidad de materia seca (Cuadro 5).

La Fig.13 muestra la producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada) en diferentes periodos de incubación influenciados por diferentes aditivos en las dietas. La producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada) se estima que se redujo debido a la suplementación de aceites y levaduras.

**Fig. 13:** Producción de gas fecal total *in vitro* (mL/0.5g de materia seca) en diferentes periodos de incubación por el efecto de inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceite de pescado (AP) y *S. cerevisiae* (SC).

CO = control, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, -SC = 0mg/g de materia seca y +SC = 4mg/g de materia seca.





Las interacciones; tipo de aceite × *S. cerevisiae*, tipo de aceite × nivel de aceite, y el nivel de aceite × *S. cerevisiae* también mostraron un incremento no significativo hacia la producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada) con aumento en el período de incubación de 8 a 48 h. Por otro lado, la interacción nivel de aceite × *S. cerevisiae* reveló un impacto significativo ( $P < 0.05$ ) al reducir la producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca degradada) hasta 48 h de período de incubación (Cuadro 5).

Cuadro 5: Efectos de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para raciones en los parámetros de fermentación fecal *in vitro*, así como la producción de gas total en diferentes períodos de incubación.

Tipo de aceite	Nivel de aceite	SC	Parámetros de fermentación		Producción de gas mL/0.5g de materia seca incubada				Producción de gas mL/0.5g de materia seca degradada			
			pH	DMS <sup>1</sup>	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
Aceite de cártamo	Bajo	-	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
	Alto	-	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
Aceite de pescado	Bajo	-	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
	Alto	-	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
SEM <sup>2</sup>			0.14	5.60	9.50	16.75	28.36	33.49	6.47	12.21	19.16	23.52
Efecto del aditivo <sup>3</sup> :												
Tipo de aceite (TA)			0.229	0.121	0.660	0.376	0.873	0.606	0.257	0.131	0.364	0.217
Nivel de aceite (NA)			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
TA × SC			0.876	0.035	0.351	0.284	0.459	0.452	0.055	0.048	0.113	0.085
TA × NA			0.876	0.024	0.668	0.866	0.948	0.740	0.165	0.090	0.160	0.092
NA × SC			0.370	0.003	0.357	0.289	0.286	0.231	0.017	0.029	0.077	0.020

<sup>1</sup>DMS Degradabilidad de materia seca (%).

<sup>2</sup>SEM error estándar de la media.

<sup>3</sup>P El valor de la interacción entre tres factores experimentales no significativa ( $P > 0.05$ ).

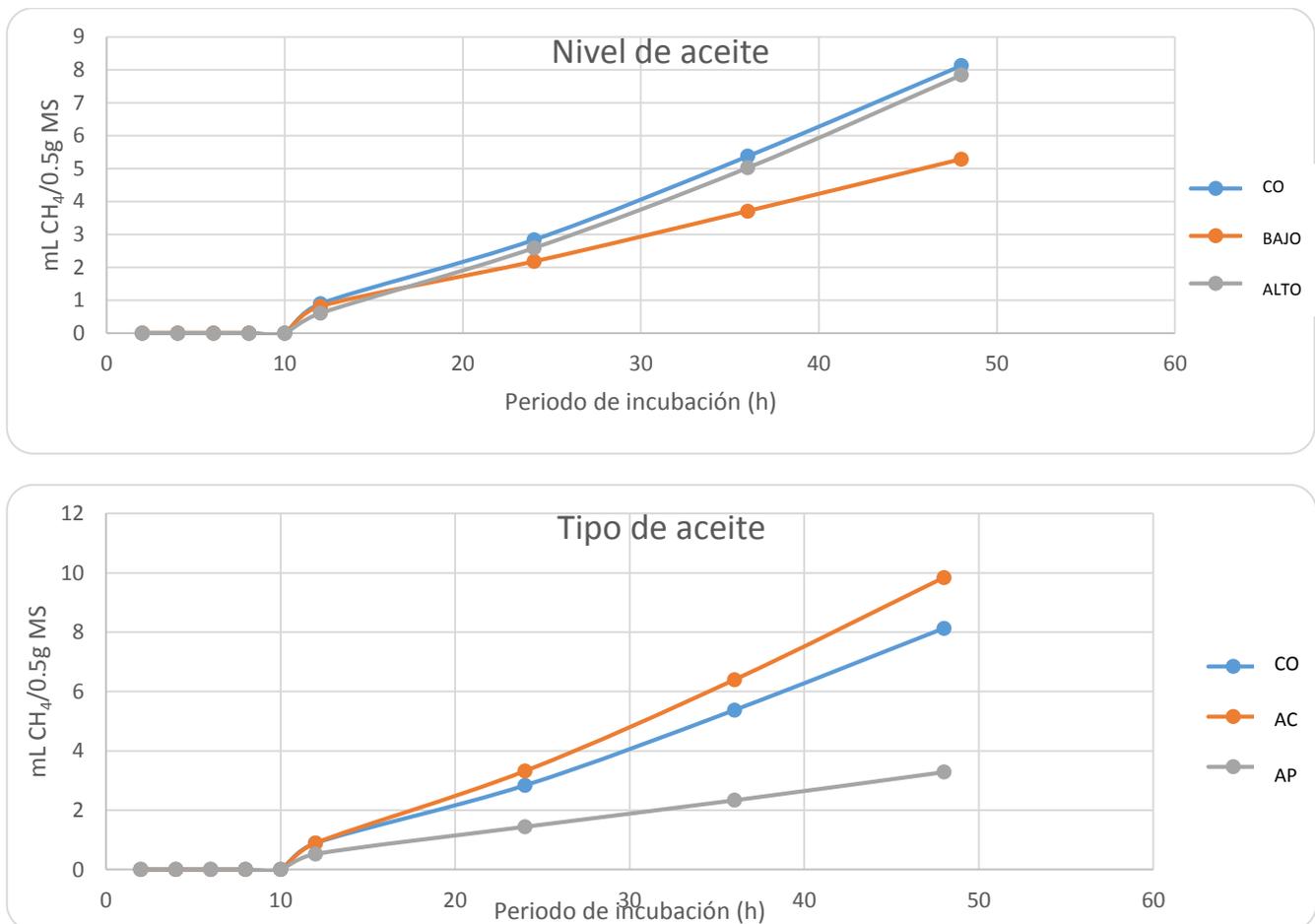
0 = Sin aditivo, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, - = 0mg/g de materia seca, + = 4mg/g de materia seca, SC = *S. cerevisiae*.

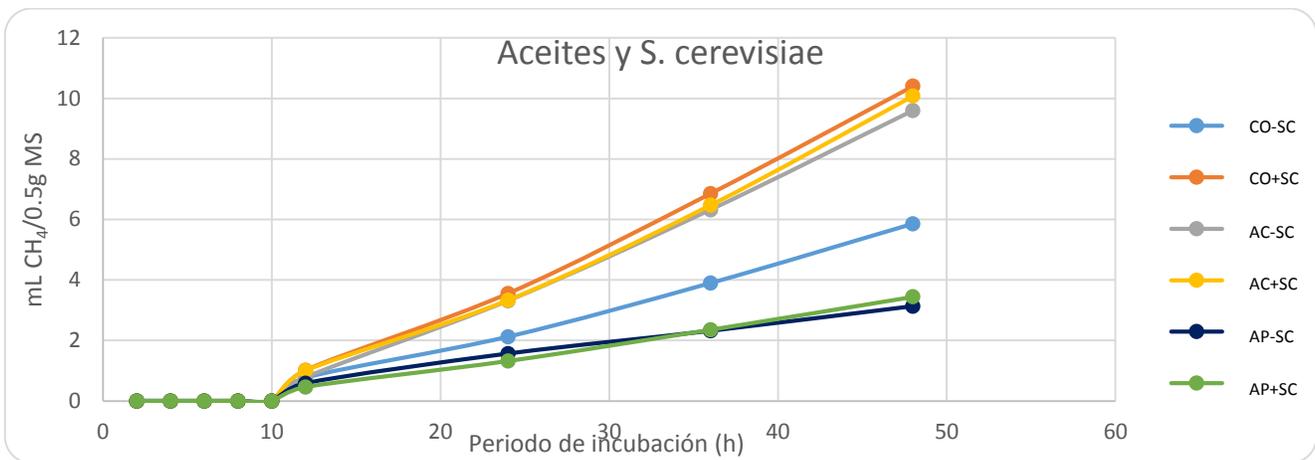
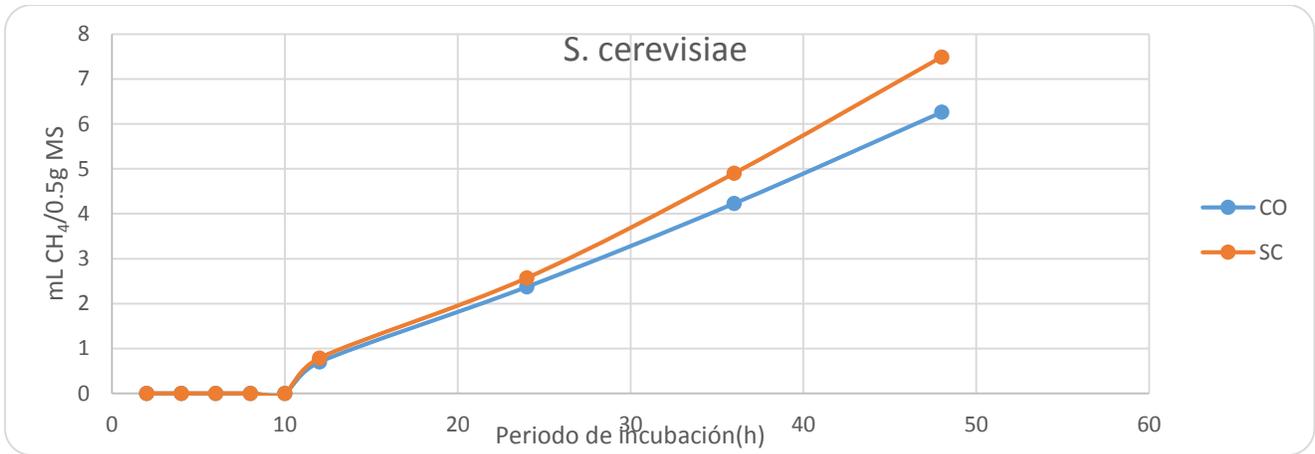
## Efecto de los aditivos sobre las emisiones de CH<sub>4</sub>

La Fig.14 muestra la emisión de CH<sub>4</sub> *in vitro* (mL/0.5g DM incubada) con aumento en el período de incubación debido a la inclusión dietética de aditivos. Hubo una falta total de producción de CH<sub>4</sub> (mL/0.5g DM incubado y mL/0.5g DM degradado) hasta 10 h de período de incubación. El aceite de cártamo y el aceite de pescado tuvieron un efecto significativo (P>0.05) en la mitigación de la emisión de CH<sub>4</sub> (mL/0.5g DM incubado y mL/0.5g DM degradado) con respecto a la dieta de control. Del mismo modo, la emisión *in vitro* de CH<sub>4</sub> (mL/0,5 g DM degradada) se redujo significativamente (P=0,005) debido a la interacción al nivel de aceite y *S. cerevisiae*.

**Fig. 14:** Producción de CH<sub>4</sub> fecal de caballo (mL/0.5g MS) en diferentes períodos de incubación afectados por la inclusión dietética de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y *S. cerevisiae* (SC).

CO = control, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, -SC = 0mg/g materia seca y +SC = 4mg/g materia seca.





La emisión proporcional de CH<sub>4</sub> fue significativamente ( $P > 0.05$ ) influenciada a las 24 y 48 h debido a la suplementación de aceite de pescado. Las interacciones entre las raciones y las dosis mostraron un impacto no significativo hacia la emisión proporcional de CH<sub>4</sub> (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de los aceites de cártamo y pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para raciones en la producción de CH<sub>4</sub> fecal *in vitro* en diferentes períodos de incubación.

Tipo de aceite	Nivel de aceite	SC	mL de CH <sub>4</sub> /0.5g de materia seca incubada				mL de CH <sub>4</sub> /0.5g de materia seca degradada				Producción proporcional de CH <sub>4</sub>			
			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
Aceite de cártamo	Bajo	-	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
	Alto	-	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
Aceite de pescado	Bajo	-	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
	Alto	-	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
SEM <sup>2</sup>			0.000	0.803	1.708	3.873	0.000	0.412	0.884	1.865	0.000	1.342	1.812	3.536
Efecto del aditivo <sup>3</sup> :														
Tipo de aceite (TA)			0.00	0.312	0.015	0.002	0.00	0.249	0.007	0.0001	0.00	0.341	0.003	0.001
Nivel de aceite (NA)			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
TA × 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
TA × NA			0.00	0.383	0.750	0.743	0.00	0.485	0.812	0.235	0.00	0.223	0.632	0.893
NA × 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

SEM<sup>2</sup> error estándar de la media.

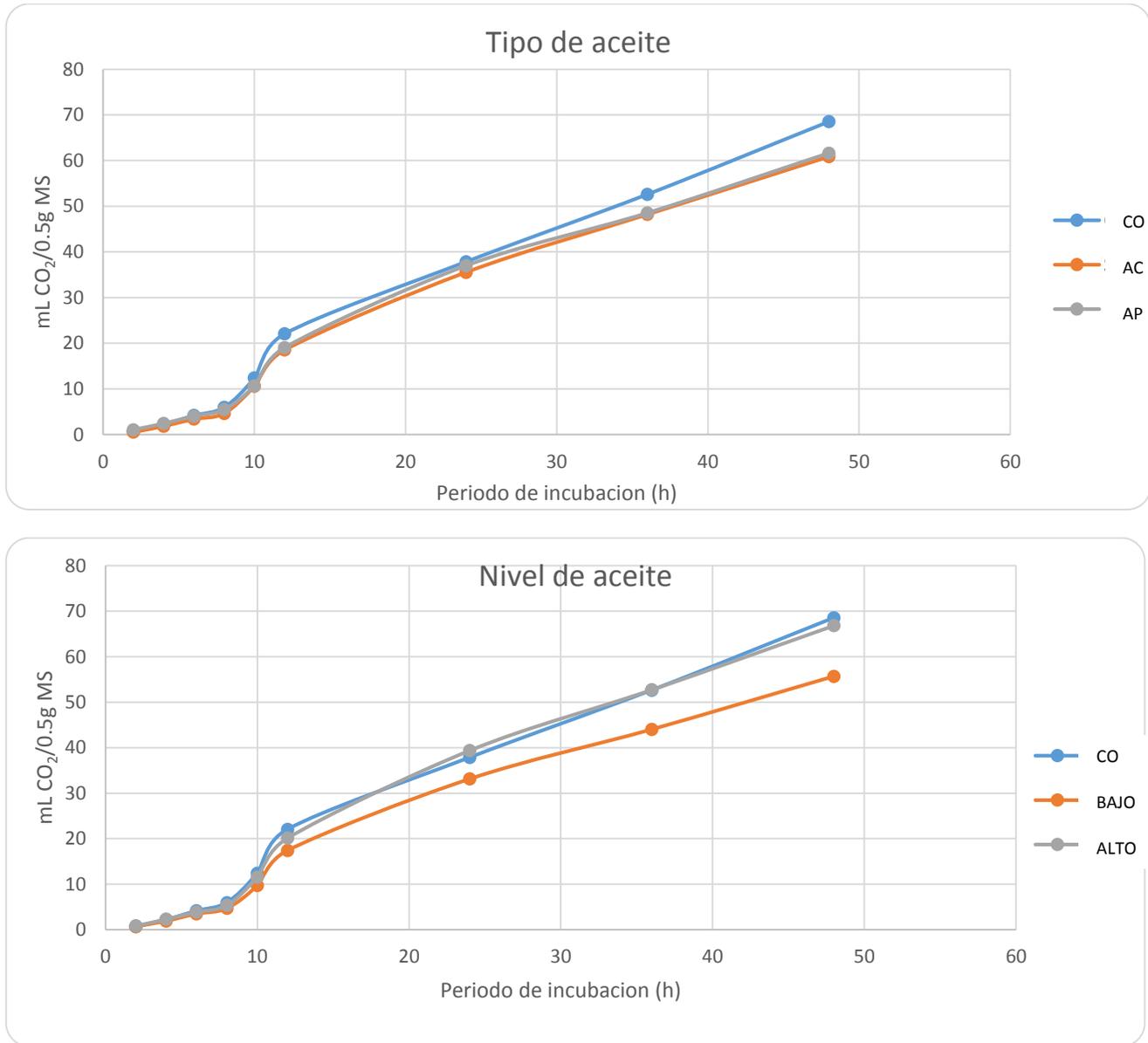
0 = Sin aditivo, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, - = 0mg/g materia seca, + = 4mg/g materia seca, SC = *S. cerevisiae*.

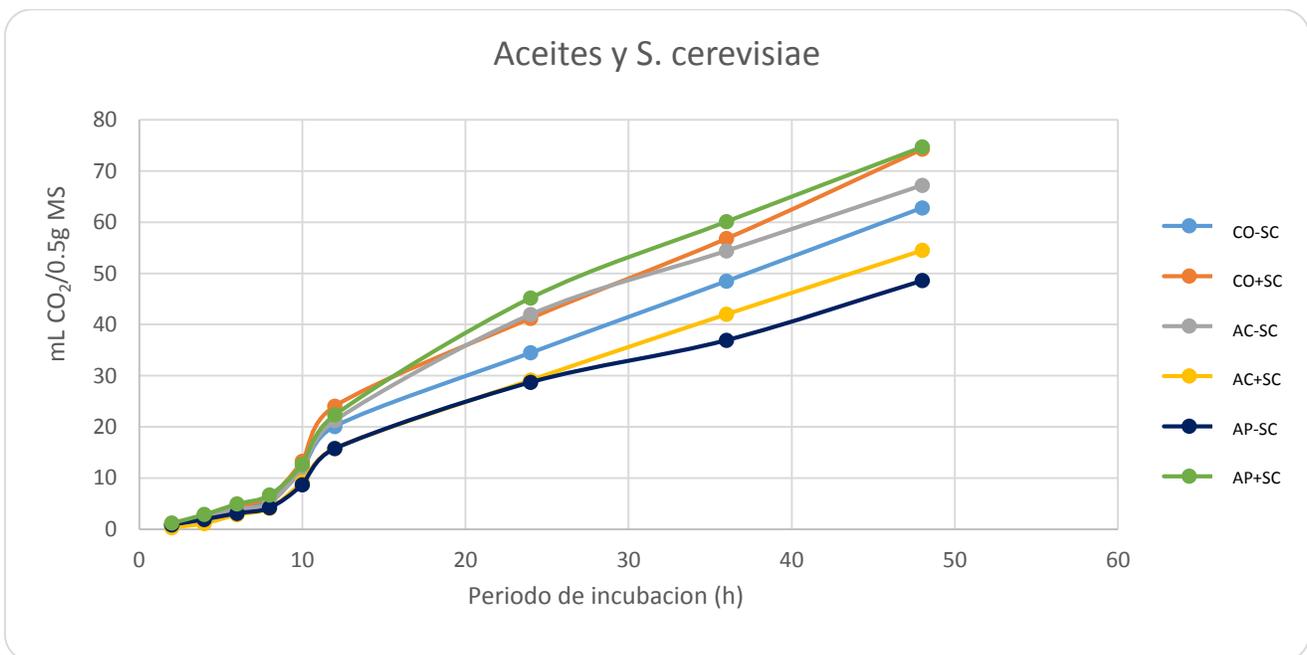
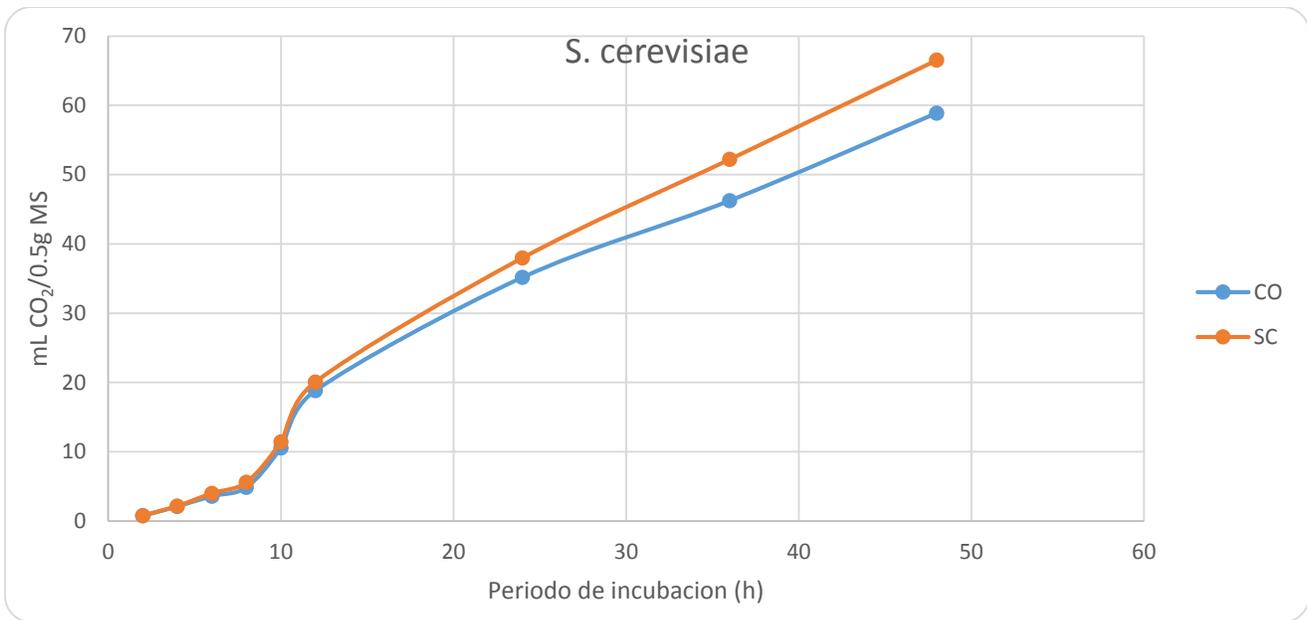
## Efecto de los aditivos sobre las emisiones de CO<sub>2</sub>

La emisión de CO<sub>2</sub> *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada) aumento en el período de incubación debido a la inclusión dietética de aditivos como se muestra en la Fig.15.

**Fig. 15:** Producción de CO<sub>2</sub> fecal de caballo (mL/0.5 g materia seca) en diferentes períodos de incubación afectados por la inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y *S. cerevisiae* (SC).

CO = control, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, -SC = 0mg/g de materia seca, y +SC = 4mg/g de materia seca.





Tanto el tipo de aceite como *S. cerevisiae* tuvieron mínimo efecto sobre la emisión de CO<sub>2</sub> (mL/0.5 g materia seca incubada) con respecto al control. Por el contrario, la emisión de CO<sub>2</sub> (mL/0,5 g de materia seca degradada) se elevó ligeramente ( $P < 0,05$ ) debido al tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* y a las interacciones del nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae*. De la misma manera, la emisión proporcional de CO<sub>2</sub> fue influenciada significativamente hasta 48 h debido a la interacción del tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* (Cuadro 7)

Cuadro 7: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para raciones en la producción de CO<sub>2</sub> fecal *in vitro* en diferentes períodos de incubación.

Tipo de aceite	Nivel de aceite	SC	mL de CO <sub>2</sub> /0.5g de materia seca incubada				mL de CO <sub>2</sub> /0.5g de materia seca degradada				Producción proporcional de CO <sub>2</sub>			
			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
Aceite de cártamo	Bajo	-	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
	Alto	-	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
Aceite de pescado	Bajo	-	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
	Alto	-	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
SEM <sup>2</sup>			2.263	7.257	14.897	21.778	1.205	4.922	9.607	15.250	6.423	7.545	8.983	7.887
Efecto del aditivo <sup>3</sup> :														
Tipo de aceite (TA)			0.404	0.870	0.831	0.939	0.929	0.413	0.511	0.425	0.295	0.163	0.400	0.325
Nivel de aceite (NA)			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
TA × 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
TA × NA			0.252	0.816	0.946	0.788	0.609	0.167	0.180	0.088	0.269	0.447	0.909	0.984
NA × 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

SEM<sup>2</sup> error estándar de la media.

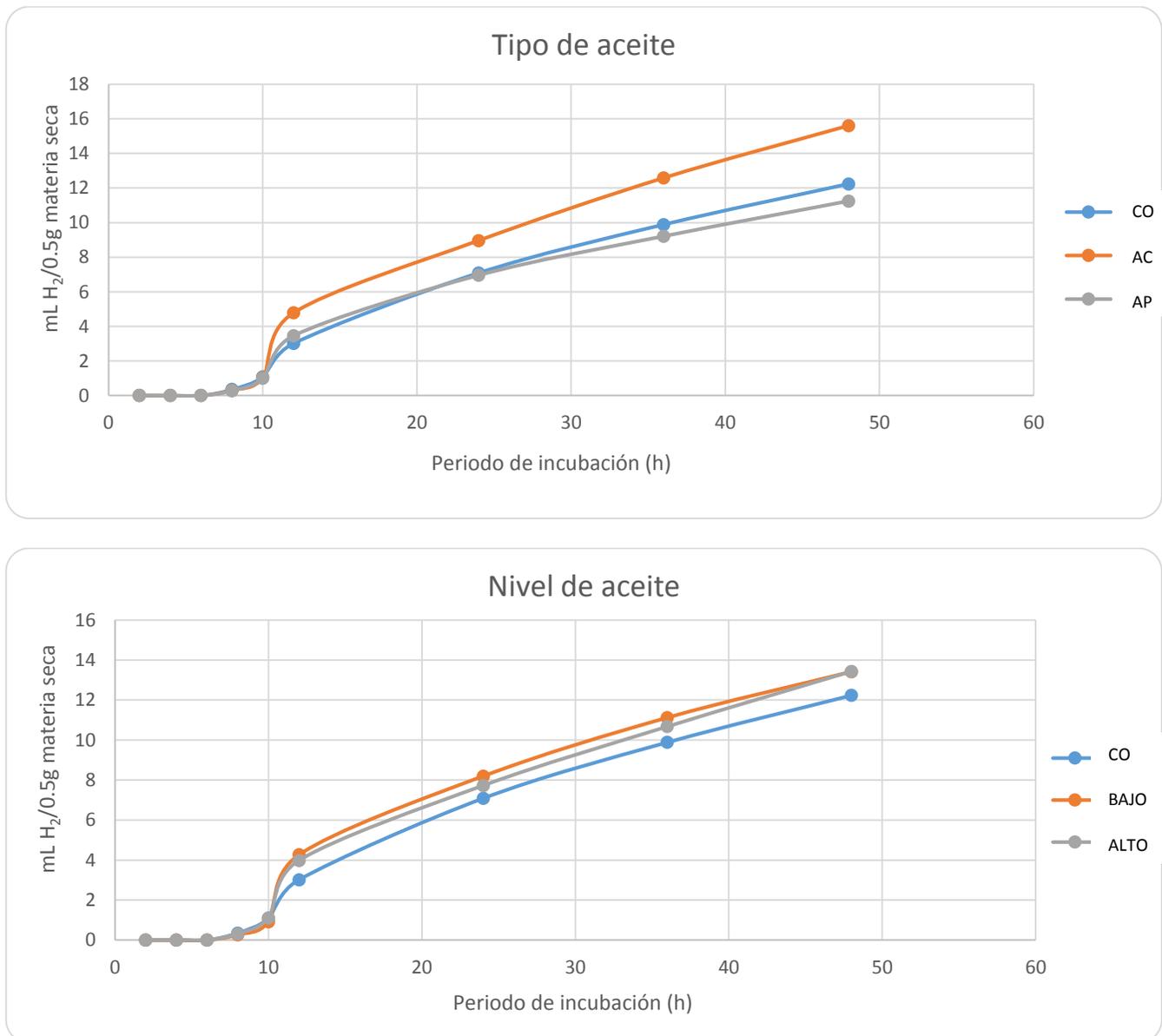
0 = Sin aditivo, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, - = 0mg/g materia seca, + = 4mg/g materia seca, SC = *S. cerevisiae*.

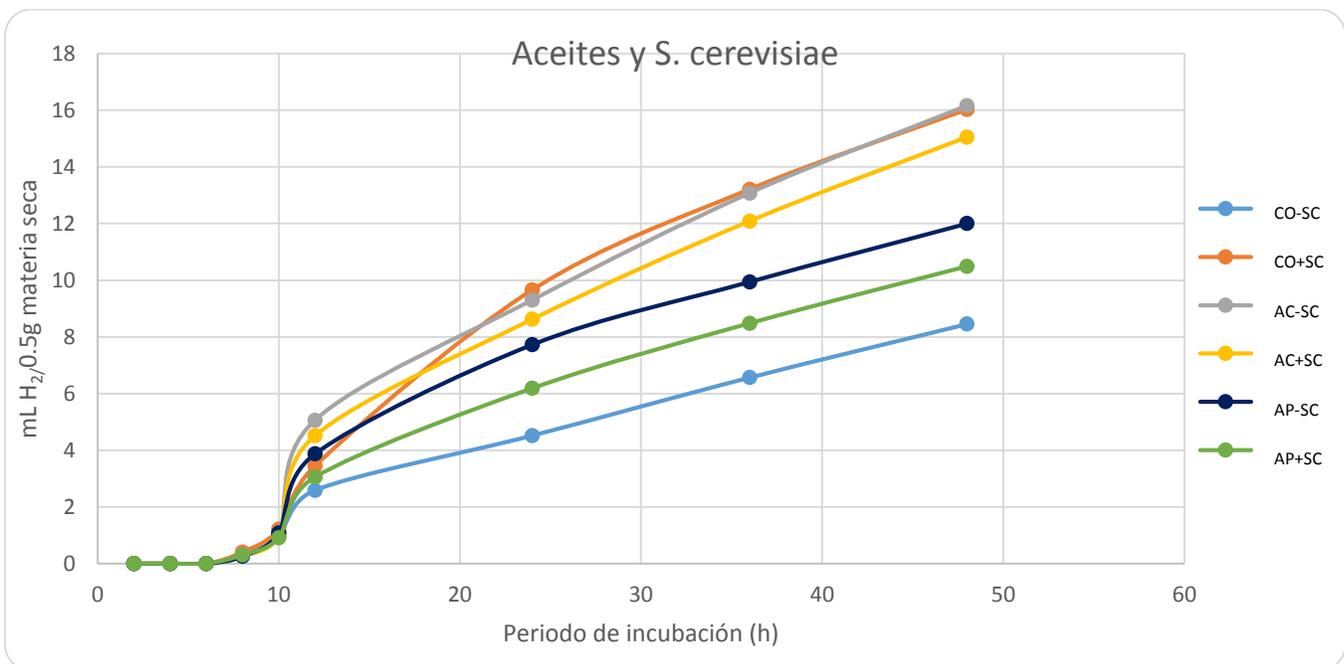
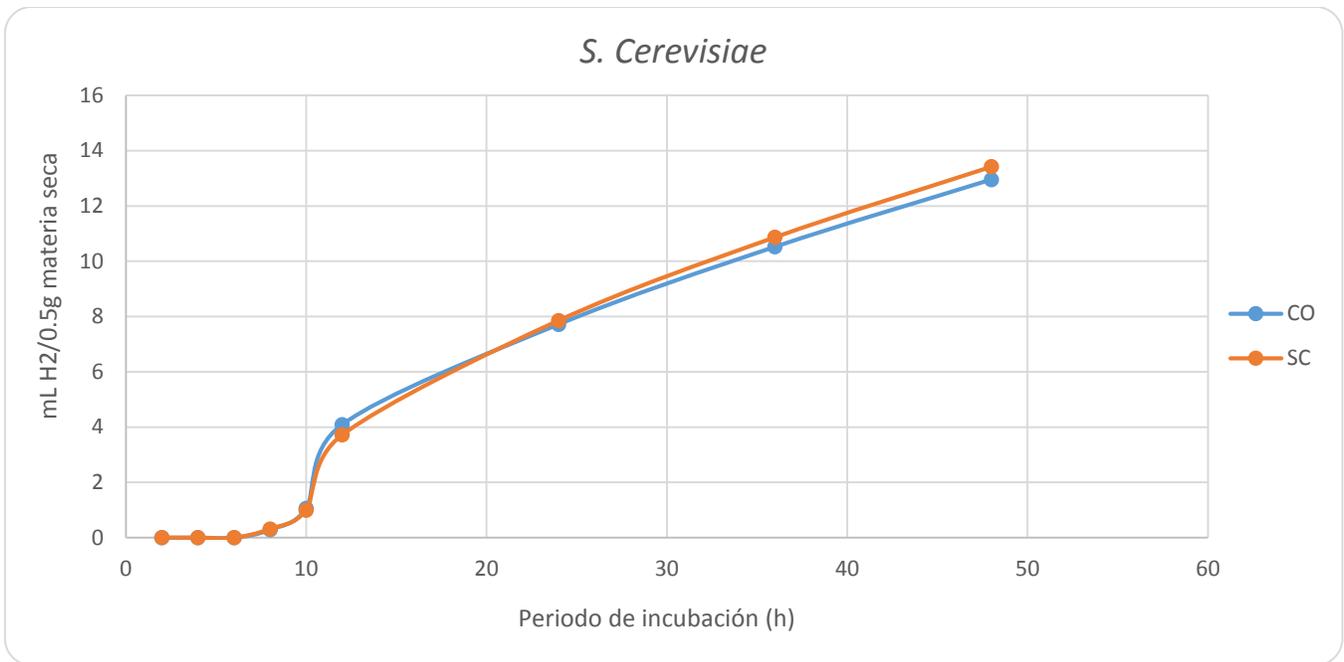
## Efecto de los aditivos en las emisiones H<sub>2</sub>

La emisión de H<sub>2</sub> *in vitro* (mL/0,5 g materia seca incubada) muestra la Fig. 16 exhibe aumento en el período de incubación debido a la inclusión dietética de aditivos. La producción de H<sub>2</sub> *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada) se incrementó ligeramente en los niveles de tratamiento con respecto al control. Por otro lado, la interacción; el tipo de aceite x *S. cerevisiae* reveló significativa (P < 0.05) mitigación en la producción de H<sub>2</sub> (mL/0.5 g materia seca degradada) sólo a las 8 y 12 h de incubación.

**Fig. 16:** Producción de H<sub>2</sub> fecal de caballo (mL/0,5 g materia seca) en diferentes períodos de incubación afectados por la inclusión dietética de aceite de cártamo (AC), aceites de pescado (AP) y *S. cerevisiae* (SC).

CO = Control, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, -SC = 0mg/g de materia seca, y +SC = 4mg/g de materia seca.





La emisión proporcional de H<sub>2</sub> fue influenciada ( $P > 0.05$ ) debido a los aceites y *S. cerevisiae* después de las 12 h del periodo de incubación (Cuadro 8).

Cuadro 8: Efecto de los aceites de cártamo y de pescado en combinación con *S. cerevisiae* como aditivos para raciones en la producción de H<sub>2</sub> fecales *in vitro* en diferentes períodos de incubación.

Tipo de aceite	Nivel de aceite	SC	mL de H <sub>2</sub> /0.5 de materia seca incubada				mL de H <sub>2</sub> /0.5 g de materia seca degradada				Producción proporcional de H <sub>2</sub>			
			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
Aceite de cártamo	Bajo	-	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
	Alto	-	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
Aceite de pescado	Bajo	-	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
	Alto	-	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
SEM <sup>2</sup>			0.107	2.343	5.931	8.894	0.068	1.274	3.286	4.872	0.039	4.065	6.852	7.934
Efecto del aditivo <sup>3</sup> :														
Tipo de aceite (TA)			0.765	0.147	0.592	0.422	0.322	0.072	0.506	0.341	1.000	0.277	0.550	0.479
Nivel de aceite (NA)			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
TA × 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
TA × NA			0.769	0.153	0.393	0.492	0.222	0.674	0.678	0.868	1.000	0.112	0.434	0.519
NA × 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

SEM<sup>2</sup> error estándar de la media

0 = Sin aditivo, Bajo = 2.4 %, Alto = 4.8 %, - = 0mg/g de materia seca, + = 4mg/g de materia seca, SC = *S. cerevisiae*.

## XI. DISCUSIÓN

Los retos actuales para mejorar la eficiencia y la productividad de los equinos a través de la manipulación de su dieta debe ser un enfoque sustancial que nos ayude para la mitigación de los gases de efecto invernadero. Sabemos que la calidad del forraje afecta directamente en el proceso de fermentación por consiguiente el rendimiento de los gases de efecto invernadero en los animales. El forraje de alta calidad consiste en sacáridos fermentables y un nivel reducido de fibra, lo que nos lleva a una alta digestibilidad, mitigando así la producción de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Las variaciones en la composición química de las dietas también son responsables de reducir la producción de gases de efecto invernadero. Actualmente, en los países en desarrollo, se realizan esfuerzos para tener alternativas alimenticias con alta digestibilidad y composición nutricional. Sin lugar a dudas estas alternativas representan y conducen a la mitigación de gases de efecto invernadero (Kataria, 2015).

Teniendo en cuenta los hechos antes mencionados, en el presente estudio, el cártamo y el aceite de pescado que son ricos en energía digestible, se utilizaron como aditivos dietéticos no sólo para mejorar la eficiencia, sino también mitigar la producción de gases de efecto invernadero en caballo. Por otro lado, se sabe que las levaduras mejoran el recuento total de la flora microbiana del intestino grueso (ciego y colón), lo que se traduce en una mejor digestibilidad y aprovechamiento del forraje. En vista de esto, también intentamos evaluar la capacidad de fermentación de la ración con la adición de dos niveles de aceites y la adición de *S. cerevisiae* (Morgan, 2006).

La producción de gas asintótico, tasa de producción de gas, y período de retraso no se vieron afectados por complementar el aceite de cártamo, aceite de pescado, y *S. cerevisiae*. El tipo de aceite y *S. cerevisiae*, el tipo de aceite y el nivel de aceite, y las interacciones del nivel de aceite y *S. cerevisiae* también mostraron un impacto no significativo en la producción de gas asintótico, la tasa de producción de gas y el período de retraso. El aumento del tiempo de retraso para la producción de gas al complementar los aceites y *S. cerevisiae* sugiere las estrategias de adaptación retardadas de la microbiota hacia las dietas. Nuestros resultados coinciden con Ferraro *et al.*, (2016) que demostró que los suplementos energéticos en la dieta del ganado estimularon la adaptación microbiana y aumentaron el período de retraso.

La interacción; nivel de aceite x *S. cerevisiae* mostró una reducción significativa en la producción de CH<sub>4</sub> asintótica. El tipo de aceite y *S. cerevisiae*, y las interacciones del tipo de aceite y el nivel de aceite mostraron un impacto no significativo en la tasa de emisión de CH<sub>4</sub>. Por otro lado, el aceite de cártamo y el aceite de pescado a 2,4 y 4,8% mostraron una influencia significativa en el período de retraso de la producción de CH<sub>4</sub>. Lo observado es similar a los resultados reportados por Elghandour *et al.*, (2016) que reveló un impacto racional en la tasa de emisión de CH<sub>4</sub> y el período de retraso de la emisión. Además, en ese estudio los autores revelaron la falta de efecto del tipo de ración x interacción de la dosis en la producción de CO<sub>2</sub>. En este estudio las interacciones; el tipo de aceite x *S. cerevisiae*, tipo de aceite x nivel de

aceite, y el nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* mostraron falta de efecto no solo sobre el CO<sub>2</sub> asintótico, la tasa, y el tiempo de retardo de CO<sub>2</sub>, sino también la emisión de H<sub>2</sub>. Actualmente no se dispone de informes que investiguen el papel sinérgico del aceite de cártamo, aceite de pescado, y *S. cerevisiae* sobre la cinética de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> en equinos; por lo tanto, no se discutió la comparación entre nuestras constataciones y los informes previos.

La suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado, y *S. cerevisiae* en concentraciones distintas no mostraron ningún impacto significativo en el nivel de pH. Elghandour *et al.*, (2016) y Lattimer *et al.*, (2007) que no obtuvieron ninguna alteración en el pH y DMS complementando la levadura en la dieta alta en concentrado representado observaciones similares. Al contrario de esto, Hernández *et. al.*, (2017) demostraron una reducción significativa en el pH y en la degradabilidad de materia seca *in vitro* al complementar el aceite de ajo en la dieta. La variación observada en este contexto podría deberse al alto rango de amortiguación del mecanismo fermentativo y a la diferente modalidad de acción de los aceites, así como a *S. cerevisiae* en la microbiota (Elghandour *et al.*, 2016).

La degradación de la ración se mide calculando la producción de gas *in vitro*. En general, los valores elevados de gas son la indicación de una mejor disponibilidad nutricional para la microbiota (Elghandour *et al.*, 2018). En esta investigación, se estima que la producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada) se incrementó debido a la suplementación de aceites y levaduras. El tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae*, aceite tipo  $\times$  nivel de aceite, y el nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* también mostraron incremento en la producción de gas *in vitro* (mL/0.5 g materia seca incubada y mL/0.5 g materia seca degradada) con aumento en el período de incubación. Los hallazgos del presente estudio coinciden con los informes de Hernández *et. al.*, (2017) que demostraron una mejora significativa en la producción de gas *in vitro* debido a la adición de *S. cerevisiae* en la dieta de alta concentración.

Los suplementos de aceite que se implementan en la dieta no sólo para lograr los requisitos de alta energía, sino también reducir la producción de CH<sub>4</sub> en animales (Martin, 2010). En el contexto actual, hemos emprendido un nuevo intento de evaluar la potencialidad del cártamo y el aceite de pescado para reducir la producción de CH<sub>4</sub> en el caballo. Los hallazgos mostraron el efecto sinérgico significativo del aceite de cártamo, aceite de pescado, y *S. cerevisiae* en la mitigación de la emisión de CH<sub>4</sub> (mL/0.5 g materia seca incubada y mL/0.5 g materia seca degradada) con respecto a la dieta de control *in vitro*. Se ha producido una falta total de producción de CH<sub>4</sub> (mL/0.5 g materia seca incubada y mL/0.5 g materia seca degradada) hasta 10 h de período de incubación. La observación similar fue reportada por Elghandour *et al.*, (2016) que estimó una emisión de CH<sub>4</sub> insignificante al comienzo del período de incubación debido a la suplementación con aditivos.

En el presente estudio, el tipo de dieta y *S. cerevisiae* no revelaron ningún impacto significativo en la emisión de CO<sub>2</sub> (mL/0.5 g materia seca incubada) con respecto al control. Por el contrario, las emisiones de CO<sub>2</sub> (mL/0,5 g de materia seca degradada) se redujeron debido al tipo de aceite  $\times$  *S. cerevisiae* y a las interacciones del nivel de aceite  $\times$  *S. cerevisiae*. Nuestros informes coinciden parcialmente con los hallazgos de Hernández *et al.*, (2017) que observaron un alto

nivel de CO<sub>2</sub> (mL/g materia seca incubada y degradada) en la dieta control y en los tratamientos con aceite. La tendencia hacia el mantenimiento de las emisiones de CO<sub>2</sub> en un período de incubación variado podría deberse a la estimulación de la capacidad de supervivencia de los microorganismos productores de propionato. De hecho, las levaduras desplazan la utilización de H<sub>2</sub> de la metanogénesis para reducir la acetogénesis por microorganismos homoacetogénicos que liberan acetato de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Mwenya *et al.*, 2004), manteniendo así la producción de CO<sub>2</sub>. Elghandour *et al.*, (2016) demostraron que la levadura a diferentes dosis no tuvo una influencia significativa en las emisiones de CO<sub>2</sub>. Además, en nuestra investigación, la interacción del tipo de aceite x *S. cerevisiae* exhibió una reducción significativa en la producción de H<sub>2</sub> (mL/0.5 g materia seca degradada) hasta 12 h de incubación. Teniendo en cuenta la falta de estudios que investigan el papel sinérgico fundamental de los aceites y levaduras en la mitigación de la producción de H<sub>2</sub> del caballo, los resultados obtenidos en este contexto no pudieron compararse con el protagonismo de los informes anteriores.

## XII. CONCLUSIONES

La utilización de aceite de cártamo, el aceite de pescado y la *S. cerevisiae* mostraron efecto significativo en al reducir la producción de gas asintótica, la tasa de producción de gas y el período de retraso de CH<sub>4</sub>.

La producción de CH<sub>4</sub> en la interacción del nivel de aceite × *S. cerevisiae* mostró una mitigación significativa (P = 0.047). Los aditivos no mostraron influencia sobre la mitigación de gas asintótica, velocidad y tiempo de retraso de emisiones de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. La inclusión de aceites de cártamo y pescado (2,4 y 4,8%) adicionado con levadura *S. cerevisiae* (4 mg/g MS) puede utilizarse para mitigar *in vitro* las emisiones de CH<sub>4</sub> en caballos.

El pH de fermentación no se vio afectado debido a la suplementación de aceite de cártamo, aceite de pescado y *S. cerevisiae* en concentraciones distintas.

Más estudios *in vivo* son necesarios para representar la eficiencia de estos suplementos como una alternativa viable para reducir la producción de gases de efecto invernadero en equinos.

### XIII. LITERATURA CITADA.

1. Bajón, M. *et al.*, 2013. Veterinarios del HVSM, 2013.
2. Beyer, M. 1998. Colic. In Pagan JD (Ed), *Advances in Equine Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham UK, Pp. 483-488.
3. 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.pone.0077599>.
4. Bonilla, D. 2013. *Sistemas de Producción Equina*, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Neiva, Colombia.
5. Brandi, RA, Furtado CA. 2009. Nutritional and metabolic importance of fiber in the horse diet. *Rev Bras Zootec*; 38:246-258.
6. Bulege, W. (2013). Emisiones de gases de efecto invernadero y cambio climático. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 03(02), 98–99. <https://doi.org/10.18259/acs.2013012>.
7. 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.
8. Church, D.C., Pond G.W., Pond R., 2004. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. México, Ed. Limusa, 113 - 325.
9. Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Visscher, G. J. and Oudshoorn, L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*. 61, 113-128.
10. Cunha, T.J. 1991. *Horse feeding and nutrition*, 2nd ed., Academic Press, Inc., San diego, California.
11. Cunningham, J., *et al.*, 2007. *Fisiología veterinaria*, Cuarta edición, Barcelona, España, ELSEVIER.
12. 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.
13. Degussa. 1996. *The aminoacid composition of feedstuffs*. Degussa AG., Frank-furt am Main, Germany.
14. 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
15. Elghandour, M., *et al.*, 2018. Horse fecal methane and carbón dioxide production and fermentation kinetics influenced by *Lactobacillus farciminis*- Supplemented diet, ELSEVIER, *Journal of Equine Veterinary Science* 62.

16. Elghandour, MMY, Kholif AE, López, S, Mendoza, GD, Odongo, NE, Salem, AZM. 2016. *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. *Journal of Equine Veterinary Science* 38; 64–71.
17. Elghandour, MMY, Kholif, AE, Salem, AZM, Montes de Oca, R, Barbabosa, A, Mariezcurrena, M, Olafadehan, OA. 2016. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *Journal of Cleaner Production* 135;194-200.
18. Elghandour, MMY, Khusro, A, Greiner, R, Salem, AZM, de la Fuente, JL, Márquez-Molina, O, Barbabosa-Pilego, A. 2018. Horse fecal methane and carbon dioxide productions and fermentation kinetics influenced by *Lactobacillus farciminis* supplemented diet. *J Equine Vet Sci* 62, 98-101.
19. FAOSTAT (The Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2014. <http://faostat3.fao.org/home/E>. 2014. (Consulta: junio 10, 2018)
20. Ferraro, S.M., Mendoza, G.D., Miranda, L.A., Guti\_erez, 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.
21. France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, 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: 143–50.
22. Frape, D. 2010. *Equine Nutrition and Feeding*, 4th ed., Willey Blackwell, Cichester, West Sussex, UK.
23. Fonnesbeck, P.V., 1969b. Partitioning the nutrients of forage for horses. *Journal of Animal Science* 28, 624–638.
24. Furtado, CE, Brandi, RA, Ribeiro, LB. 2011. Utilização de coprodutos e demais alimentos alternativos para dietas de equinos. *Rev Bras Zootec.*; 40:214-223.
26. Gallagher, K., Leech, J., Stowe H. 1992. Protein, energy and dry matter consumption by racing Standardbreds-a field survey. *Journal of Equine Veterinary Science* 12, 382-388.
27. García, A. E. 2001. Importancia de los concentrados de levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) en el desempeño productivo y la calidad de la canal de bovinos de engorda. *Memorias de XL Seminario Internacional de Actualización Sobre Engorda de Ganado Bovino en Corral*. Monterrey, México.
28. 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; 475-478
29. Geelen SNJ, Blazquez C., Huelen MJH, Sloet van Oldruitenborgh-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

30. Getachew, G., M. Blummel, H.P.S. Makkar, K. Becker. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 72: pp. 261-281.
31. 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.
32. Hernandez, A.E. Kholif, R. Lugo-Coyote, M.M.Y. Elghandour, M. Cipriano, G.B. Rodríguez, N.E. Odongo, A.Z.M. Salem. 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. *Journal of Cleaner Production* 142; 2384-2392.
33. Hyypä, 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.
34. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2013. Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Stocker, T. F., D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P.M. Midgley (eds.). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
35. Jouany, J.P., Gober J., Medina B., Bertin G., Julliard V. 2008. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high fiber or high starch diet. *J Anim Sci*; 86: 339-47.
36. 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.
37. Kataria, RP. 2015. Use of feed additives for reducing greenhouse gas emissions from dairy farms. *Microbiology Research*; 6: 6120. doi:10.4081/mr.2015.6120
38. Kronfeld, D.S., and Harris P. 2005. Feeding the Athletic Horse. Pages 61-77 in the Veterinarians Practical Reference to Equine Nutrition. K.N. Thompon, ed. Purina Mills Inc. AAEO, St. Louis MO.
39. Lattimer, J.M., Cooper S.R., Freeman D.W., Lalhman D.A. 2007. Effect of *Sacharomyces cerevisiae* on *in vitro* fermentation of a high concentrate or high fiber diet in horses using equine fecal inoculums in a Daisy II incubator. *J Anim Sci*; 85: 2484- 91.
40. Lindberg, JE., Essén-Gustavsson B., Dahlbornk., *et al.*, 2006. Exercise response metabolism at rest and digestibility in athletic horses fed high fat oats. *Equine Veterinary Journal, Supplement* 36, 626-630.
41. López, A. D., *et. Al.*, 2008. Ruminal inoculums and digestibility in situ of three browse foliages contain tannins. In 9th International Conference on Goats.
42. Makkar, H.P.S. 2001. Effect and fat of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to detrimental effects of feeding tannins-rich feeds. *Small Ruminant Research.* 49, 241-256. Overcome.

43. Manríquez, H. J. A. 1994. La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos. Deposito de documentos de la FAO. 269 p.
44. Martin, C, Morgavi DP, Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*;4:351-65.
45. Medina, M., Giraldo D.I., Jacotot E. and Jullian 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.
46. Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimations of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, 7-55.
47. Mersales, D. 2017. Digestión equina, Equisan.com, la clínica equina en la web, Documento en línea, consultado el 12/02/19. Disponible en: <http://equisan.com/images/pdf/digestiones.pdf>
48. Morgan, LM. 2006. Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying quality forage in mature horses. MSc Thesis. Atlanta, GA: University of Georgia.
49. Montzka, S. A., E. J. Dlugokencky, and J. H. Butler. 2011. NonCO<sub>2</sub> greenhouse gases and climate change. *Nature* 476: 43-50
50. Mwenya, B, Santoso B, Sar C, Gamo Y, Kobayashi T, Arai I, Takahashi J. 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.
51. 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.
52. NRC, 2007. In: The nutriment requirements of horses, 6th revised edition National Academy press, Washington DC.
53. Oliveira, GJC, Lima JAF, Araújo KV, Fialho ET, Bertechini AG, Pérez JRO, Freitas RTF. 2002. Effect of Pectin and Soybean Meal Addition on the Apparent Digestibility of Nutrients, in Horses. *Rev Bras Zootec*; 31(3):1184-1192.
54. Opatpatanakit, Y., Kellaway, R. C., Lean, I. J., Annison, G., Kirby, A. 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Australian Journal of Agricultural Research*. 45, 1247-1263.
55. Pagan, J.D. 1998. *Advances in Equine Nutrition*, 1st ed., Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK.
56. Pell, A.N., Doane, P.H., Schofield, P. 1997. *In vitro* digestibility and gas production. In: Simposio sobre Tópicos Especiales en Zootecnia, Lavras, MG, 109-132.
57. Pérez De Ayala, P. 1995. *Nutrición y alimentación del caballo*, Editorial Trouw Ibérica S.A. Barcelona., FEDNA Curso especialización.
58. Pilliner, S. 1993. *Horse Nutrition and feeding*, 1st ed., Blackwell Scientific publications, Osney Mead, Oxford.

59. Posada, S.L. y Noguera, R.R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 17, 4.
60. 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.
61. Ramírez, D.M. 2008. Comunicación personal. Gerente de producción. Biotecap SA de CV.
62. 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.
63. Robertson, P. 2004. Abatement of nitrous oxide, methane, and other non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases: The need for a system approach. pp. 493-506. In: C. R. Field and M. R. Raupach. (eds.). *The Global Carbon Cycle Integrating Humans, Climate, and the Nature World*. Scope 62. Island Press. Washington, DC, USA.
64. Rossister, M. 2008. The effect of fat supplementation on digestion parameters in the horse (M. Sc. Thesis). Oklahoma State University, Oklahoma, USA.
65. Shimada, M. A. 2009: *Nutrición Animal*. Trillas, S.A. de C.V. México, D.F. 397 p.
66. Theodorou, MK, Williams, B.A; Dhanoa, M.S; Mc Allan, AB and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48: pp 185-197.
67. Varloud, M. Fonty, G., Roussel, A., Guyonuarch, 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.
68. Venter, M., 2007. Guía para la alimentación equina. Documento en línea, consultado el 13/02/19. Disponible en [www.ergonomix.com/guia\\_practica\\_alimentacion\\_s\\_articulos\\_267\\_CAB.html](http://www.ergonomix.com/guia_practica_alimentacion_s_articulos_267_CAB.html)
69. Vieyra, S.A., Martínez, S.N.V., 2001. Determinación de las características de degradación ruminal, a través de técnica de producción de gas *in vitro*, Tesis de Maestría, UAEM, CICA, Toluca, México.
70. Williams, B.A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens, D. I., Owen, E., Omed, H. M. and Axford, R. F. E. (editors). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475.