



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

**“INFLUENCE OF SUNFLOWER OIL AND *Schizochytrium microalgae*
ON RUMINAL METHANE AND CARBON DIOXIDE EMISSIONS OF
TOTAL MIXED RATION IN STEERS”**

**ARTICULO ESPECIALIZADO PARA PUBLICAR EN
REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ADRIANA GABARRÓ FERNÁNDEZ

Asesores

DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR

DR. ABDEFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

DR. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ



Toluca, Estado de México, Agosto de 2017

DEDICATORIA

Éste artículo científico se lo dedico a mis papás, hermanas, profesores, asesores, tutor, revisora, amigos y compañeros que formaron parte de estos 5 años y medio de vivencias dentro y fuera de mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, les agradezco por guiarme, darme fuerza y enseñarme a enfrentar cualquier circunstancia que se me presentara, gracias por los consejos, comprensión, paciencia, tolerancia y perseverancia para ayudarme a conseguir todos mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

En ésta etapa tan importante de mi vida debo darles las gracias por todo el apoyo a mi papá: José Francisco Gabarró García, mi mamá: Silvia Alejandra Fernández Mora, mis hermanas: Thalía Gabarró Fernández y Mariana Gabarró Fernández, a mis asesores: Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour, Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem y Roberto Montes de Oca Jiménez, a todos mis profesores, a mi tutor: Luis Fernando Vega Castillo, mi revisora y profesora: María Uxúa Alonso Fresán, compañeros y amigos que formaron parte de estos 5 años y medio de vivencias dentro y fuera de mi hermosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, me siento muy orgullosa de pertenecer a la Universidad Autónoma del Estado de México, no lo hubiera logrado sin ustedes.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 FISIOLÓGIA DIGESTIVA DEL RUMIANTE	5
3. ECOSISTEMA RUMINAL	5
3.1. DESARROLLO PRENATAL DE LOS BOVINOS	5
4. CARACTERÍSTICAS DEL RUMEN	6
4.1. PROCESO FERMENTATIVO.....	7
4.2. IMPACTO DEL pH EN LA DIGESTIBILIDAD	8
4.3. MICROBIOTA RUMINAL.....	8
5. JUSTIFICACIÓN	11
6. HIPÓTESIS	12
7. OBJETIVOS	13
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
7.2.1. PRIMER OBJETIVO:	13
7.2.2. SEGUNDO OBJETIVO:.....	13
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
8.1. SUSTRATO Y TRATAMIENTOS	14
8.2. FERMENTACIÓN IN VITRO Y BIODEGRADACIÓN	14
8.3. TOTAL DE BACTERIAS Y PROTOZOARIOS.....	17
8.4. ANÁLISIS QUÍMICOS.....	18
8.5. CÁLCULOS	19
8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
9. REFERENCIAS.....	21
ANEXO ARTICULO.....	27
Influence of sunflower oil and <i>Schizochytrium</i> microalgae on ruminal methane and carbon dioxide emissions of total mixed ration in steers.....	27

1. INTRODUCCIÓN

La producción ganadera contribuye con alrededor del 18% de metano (CH⁴) y el 9% de las emisiones de dióxido de carbono (CO²) de producción, que se han implicado en causar el cambio climático. El metano, CO², hidrógeno (H²) son los principales gases producidos durante la fermentación ruminal, lo que provoca una pérdida de 2 a 12% de la energía de la dieta de los rumiantes (Johnson y Johnson, 1995).

Mejorar la utilización de piensos y el rendimiento animal es el principal objetivo de los nutricionistas; Sin embargo, deben considerarse las obligaciones sociales y ambientales para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Se han utilizado estrategias nutricionales incluyendo levadura (Elghandour *et al.*, 2017), sal de ácidos orgánicos (Elghandour *et al.*, 2016), enzimas exógenas y aceites esenciales para controlar la producción de metano ruminal de los rumiantes (Kholif *et al.*, 2017B).

Se cree que la inclusión de lípidos en las dietas de los rumiantes es una buena estrategia para reducir la producción de GEI de los rumiantes (Hook *et al.*, 2010), a través de la reducción de las concentraciones de protozoos ruminales (Abu Bakr *et al.*, 2013) en el rumen. Además, la inclusión de lípidos dietéticos ricos en ácido docosahexaenoico (DHA) puede mejorar el valor nutritivo del producto final de la producción de rumiantes (por ejemplo, leche y carne) y mejorar el rendimiento animal (Kholif *et al.*, 2016). El DHA es un ácido graso poliinsaturado ω - 3 (PUFA) que se puede utilizar como una estrategia para enriquecer la leche y la carne con los ácidos grasos DHA, que tienen varios efectos favorables sobre la salud humana. Los aceites vegetales y las microalgas son fuentes ricas de ácidos grasos insaturados (UFA) incluyendo ácidos grasos DHA y ácidos linoleicos conjugados (CLA).

La adición de aceites vegetales a las raciones de animales lactantes es una estrategia para alterar la proporción de ácidos grasos saturados (SFA) y UFA en los productos animales a través de la biohidrogenación ruminal extensiva (Kholif *et al.*, 2016). El aceite de girasol (SFO) es una fuente rica en ácido linoleico, y puede aumentar el CLA en el producto animal (Morsy *et al.*, 2015). Morsy *et al.* (2015) y Kholif *et al.* (2016) observaron que la alimentación de aceites vegetales modificó el perfil de ácidos grasos sin efectos negativos en la fermentación ruminal o la digestibilidad de nutrientes.

La microalga (*Schizochytrium spp.*) es rica en ácidos grasos de la dieta y el contenido de proteínas por lo que es como un suplemento alimenticio adecuado para mejorar la utilización del alimento y el rendimiento productivo (Burnett *et al.*, 2017). Es una fuente rica de PUFAs de cadena larga incluyendo DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA), por lo tanto, se puede utilizar para inhibir la biohidrogenación *in vitro* de los ácidos grasos, lo que resulta en la reducción en la cantidad de SFA y un aumento en UFA (Boeckaert *et al.*, 2007). La Microalga *Schizochytrium* también ha demostrado que aumenta la concentración de DHA en la leche de los becerros (Moate *et al.*, 2013). Al igual que los aceites, se deben tener en cuenta los efectos negativos de los altos niveles de inclusión de microalgas, ya que los altos niveles pueden reducir la ingesta de alimentos y la digestión de las fibras (Burnett *et al.*, 2017).

Las diferentes especies de rumiantes tienen diferente capacidad para digerir los alimentos (Aderinboye *et al.*, 2016). Por lo tanto, es importante examinar las probables diferencias en la capacidad fermentativa de las poblaciones microbianas en novillos ofreciendo la misma dieta y las condiciones de fermentación.

El ecosistema ruminal contiene una gran variedad de bacterias anaerobias obligadas, hongos y protozoarios que son seleccionados para el buen funcionamiento del rumen (Forsberg y Cheng, 1992).

La alimentación de los rumiantes es muy importante para obtener energía por medio del trabajo de las enzimas ruminales que digieren los compuestos fibrosos que se fermentan para ser ácidos grasos volátiles absorbidos y utilizados como fuente de energía (Chesson y Forsberg, 1997).

Así pues, la composición de la pared celular de las plantas está formada por una diversidad de polisacáridos de los que destacan la celulosa, hemicelulosa y la lignina (Jung *et al.*, 1991).

La lignina es particularmente una barrera que dificulta que exista una adecuada hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa (Cheng *et al.*, 1999). Por lo que el ingreso de las enzimas degradantes a la planta se ve limitado.

A pesar de esto, la alimentación de los rumiantes continúa basándose en subproductos con un elevado contenido lignocelulósico, el cual por su baja calidad nutricional dificulta la digestión.

Por lo tanto si la dieta se basa en residuos agrícolas, la degradabilidad de los polisacáridos y el beneficio nutricional debería ser redituable (Hamer, 2003; Angenent *et al.*, 2004, Das y Singh, 2004, Haight, 2005).

Si se mantiene una ración adecuada de ácidos grasos en los animales puede minimizar costos de producción, mejorando la sustentabilidad y las utilidades de las operaciones pecuarias.

Por otra parte, la industria agropecuaria puede proporcionar alimentos funcionales naturales saludables, sustentables y amigables con los animales. Esto se puede alcanzar simplemente al integrar ácidos grasos esenciales en la dieta de los animales. Los animales disfrutarán de los beneficios, mientras los granjeros producirán alimentos de alta calidad para sus consumidores. Dando así la oportunidad de integrar en la dietas de los seres humanos ingredientes que ayudarán a la salud.

Los productores están buscando dietas que contengan microalgas y nuevos ingredientes que les ayude a mejorar la salud y productividad de sus animales. Al enriquecer el alimento naturalmente, los granjeros producen animales saludables, proveen a los consumidores dietas saludables y ofrecen a los puntos de venta productos naturales y sanos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISIOLÓGIA DIGESTIVA DEL RUMIANTE

Estos animales son capaces de alimentarse de pradera, ensilado y forraje porque pueden digerir los componentes de estos forrajes como celulosa y hemicelulosa. (Relling y Mattioli, 2003).

Según (Weimer, 1998), se debe acelerar el trabajo de la microbiota ruminal para digerir la fibra.

Cualquier tipo de alimento y agua que el animal consuma se fermenta para ser absorbido y dejar actuar a las células microbianas, ácidos grasos volátiles y gases como dióxido de carbono y metano (McDonald *et al.*, 1995).

El animal y el rumen trabajan en equipo, ya que el animal consume alimento creando el medio adecuado con anaerobiosis y pH para el desarrollo de bacterias que le darán energía para su desarrollo y ciclo productivo (Hamada, 1976, citado por Angeles, 2000).

3. ECOSISTEMA RUMINAL

3.1. DESARROLLO PRENATAL DE LOS BOVINOS

El desarrollo fetal del estómago es rápido, distinguiendo los distintos comportamientos a los 56 días (Church, 1988). Los divertículos gástricos se desarrollan de una dilatación fusiforme del intestino primitivo (Church, 1988). A los 28 días en los embriones bovinos se presenta un estómago primitivo similar al de los embriones mamíferos (9,5 mm), pero a los 36 días se manifiestan diferencias en el tejido epitelial y a los 56 días ya se distinguen perfectamente bolsas definitivas

(50 mm). Ya que son evidentes los 4 departamentos gástricos se aprecia que están alineados uno tras otro, ocupando una posición caudal al hígado y al diafragma; en forma de herradura, se desplaza el esbozo del rumen y el retículo hacia la izquierda y arriba, el omaso hacia la derecha y abajo, y el abomaso a la izquierda (McDonald *et al.*, 1995). El rumen se encuentra entre el diafragma y el riñón primitivo, aumentando su tamaño y desarrollando sus sacos ciegos; girando en dirección caudal para alcanzar su posición definitiva; el abomaso cambia de posición hacia el lado derecho, debido a un desplazamiento del hígado; estos movimientos son los que permiten a los divertículos gástricos crear su forma típica de herradura. El tamaño de los 4 departamentos gástricos varía en el curso del desarrollo prenatal; al inicio todos tienen las mismas dimensiones, después sobresale el rumen cuando hace su giro, y más adelante se aprecia un incremento notable del abomaso superando el volumen del rumen al nacer (McDonald *et al.*, 1995). Al mismo tiempo que el desarrollo externo, se da el desarrollo de la mucosa de los compartimentos gástricos, primero se observa en este orden: el esbozo de las hojas del omaso, los pliegues del abomaso, las crestas del retículo y las vellosidades del rumen (McDonald *et al.*, 1995). La superficie epitelial se desarrolla más lento, por lo tanto la superficie interna del rumen es lisa durante la etapa fetal, sin papilas visibles (Weimer, 1998).

4. CARACTERÍSTICAS DEL RUMEN

Se define según (Relling y Mattioli, 2003), al rumen y al animal como dos organismos independientes en donde se deben encontrar los ingredientes óptimos para la dieta que alimentará al rumen y que posteriormente se nutra el animal.

La característica primordial es el pH entre 5.5 hasta 7 (Krause y Oetzel, 2006 citado por Araujo y Vergara, 2007), considerando el tipo de dieta proporcionada, para que

exista una microbiota adecuada y así una mejor digestión, energía y ganancia de peso en los animales.

Otra característica relevante que debe tener el rumen es la temperatura de la cámara de fermentación siempre debe estar entre los 38 a 42 °C, para que se generen las bacterias ruminales (Relling y Mattioli, 2003).

4.1. PROCESO FERMENTATIVO

Todos los rumiantes tienen la capacidad de transformar a la celulosa y la hemicelulosa que (Ladisich, *et al.* 1990), forman aproximadamente el 70 % de la biomasa vegetal.

El tipo y número de microorganismos en el rumen están asociados con los ingredientes de la dieta del animal (Fébel y Fekete, 1996).

El objetivo de que los microorganismos lleven a cabo la fermentación es producir Ácidos Grasos Volátiles, acético, butírico, propiónico y láctico; los cuales serán la fuente nutricional para la actividad metabólica del rumiante, por lo cual el rendimiento de producción del animal está relacionado a la actividad y calidad de la microbiota ruminal; además de la formación de otros compuestos como gases en su mayoría metano y dióxido de carbono (Roderick y White, 1990). La composición de los gases según (Calsamiglia y Ferret, 2002); es de 65% de CO₂, 27% de CH₄, 7% de N₂, 0.6% de O₂, 0.2% de H₂ y 0.01% de H₂S que se expulsan mediante el eructo.

4.2. IMPACTO DEL pH EN LA DIGESTIBILIDAD

Los cambios drásticos en el pH alteran la cantidad y funcionamiento normal del rumen, haciendo que la digestión de la fibra se desplome volviendo al animal susceptible a pérdida del apetito y a una disminución de la motilidad ruminal que lo predispone a consecuentes trastornos metabólicos; siendo los animales más afectados los que están bajo un régimen alimenticio a base de concentrados en su mayoría. Lo ideal es que el rumen mantenga un punto de equilibrio entre 6.2 y un 7 (Ash, 1959 citado por Krausen *et al.*, 2002).

Para que exista una buena producción de Ácidos Grasos Volátiles se debe mantener el pH, ya que mientras mayor sea la cantidad de bacterias fibrolíticas estos estarán siempre disponibles para el desarrollo del rumiante (Dirkensen, 1969 citado por Calsamiglia, 1997).

4.3. MICROBIOTA RUMINAL

La microbiota ruminal es muy importante en todo el proceso de alimentación, autores como (McDonald *et al*, 1995), nos dicen que hay entre 10^9 - 10^{10} UFC y más de 60 especies, la cantidad de hongos varía entre un 8 a un 10 % del total de la población ruminal y el ciclo de vida de estos organismos es en dos tiempos, el primer tiempo es en una zoospora capaz de moverse y el segundo tiempo es un esporangio capaz de adherirse con la ayuda de sus rizoides a las partículas del alimento, mientras que los protozoarios según (Tricarico *et al*, 2005); se encuentran de 10^5 a 10^6 células/gramo de líquido ruminal

Según (Church, 1988) el gas formado en el retículo-rumen consiste principalmente en dióxido de carbono y metano y la composición es muy distinta a la de la atmósfera (Tabla 1):

Tabla 1: Composición del gas del rumen y de la atmósfera (%)

Gas	Fórmula química	Rumen (%)	Atmósfera (%)
Dióxido de carbono	CO ₂	65	0.04
Metano	CH ₄	27	-
Nitrógeno	N ₂	7	78.6
Oxígeno	O ₂	0.6	20.8
Hidrógeno	H ₂	0.2	-
Sulfhídrico	H ₂ S	0.01	-

Una vaca lechera de alta producción, que tiene un alto consumo de alimento, puede producir unos 600 litros de gas por día. Claro está que ese gas tiene que ser eructado para que no provoque problemas respiratorios. Cualquier proceso que evite la eructación implica una acumulación del gas en el rumen (meteorismo) que lleva a distensión de ese órgano que comprime los pulmones. Si no se toman medidas, una vaca con meteorismo muere por asfixia.

La formación de gas está íntimamente relacionada con la condición de anaerobiosis del retículo-rumen. En los procesos metabólicos participan enzimas para catalizar a las reacciones, ayudadas por los co-factores nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y flavina adenina dinucleótido (FAD). Los co-factores se reducen captando hidrogeniones resultantes de las reacciones químicas. Los co-factores deben ser reciclados por que existen en cantidades limitadas en el medio. Deben ser oxidados para poder ser utilizados de nuevo. En condiciones de aerobiosis los cofactores se oxidan en el sistema de la citocromo-oxidasa con una producción adicional de ATP. El oxígeno no es abundante en el rumen, y por lo tanto, se necesita otro mecanismo para oxidar a los co-factores. Si no existiesen esos otros mecanismos la fermentación se detendría. En el rumen existen bacterias metanogénicas que facilitan la reducción de CO₂ y H₂ en metano y agua, consumiendo los hidrogeniones provenientes de los co-factores. Sin las bacterias metanogénicas no se puede formar metano. Estas bacterias son muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente a cambios en el pH. Su rango óptimo es de 6.5 a 7.0

aproximadamente y es similar al de las bacterias celulolíticas. Estos dos tipos de bacterias están íntimamente relacionadas y están asociados a la producción de acetato. En la formación de acetato se libera CO₂ necesario para la formación de metano, por lo que existe una relación directa entre la formación de acetato y metano. El otro mecanismo para oxidar a los co-factores es la formación de agua a partir de hidrogeniones y oxígeno. Si bien el oxígeno no abunda en el rumen, cuando se produce propionato por la vía aleatoria (vía oxaloacetato) se libera oxígeno molecular y éste puede ser utilizado para formar agua. Esto implica que si se produce menos metano, se tiene que producir más propionato, ya que los hidrogeniones deben ser captados en algún proceso para que se regeneren los cofactores.

La producción animal es una fuente importante de emisión de gases de efecto invernadero (GEI) en todo el mundo. Dependiendo del enfoque utilizado para la cuantificación y del tipo de emisiones estudiadas, diferentes instituciones (IPCC, FAO, EPA y otras) han calculado que la contribución del ganado a las emisiones mundiales de los GEI antropogénico representan entre el 7 y el 18% de las emisiones totales (Abecia *et al.*, 201).

5. JUSTIFICACIÓN

En los becerros es muy importante una tasa de crecimiento adecuada para llegar a la edad productiva con la mejor condición corporal y con un óptimo estado de salud, el fundamento para conseguir esto es una dieta balanceada, con ingredientes como heno de alfalfa, maíz amarillo molido, harina de soya, y salvado de trigo , que tengan aditivos como la Microalga *Schizochytrium* y aceite de girasol que no repercutan en la Salud Pública; pero que tengan la capacidad de mejorar la digestión y reducir la emisión del metano en rumiantes con menor incidencia de enfermedades, y se garantizarán animales con un futuro más productivo.

6. HIPÓTESIS

El uso de estos aditivos (Microalga *Schizochytrium* y aceite de girasol) combinados con la dieta balanceada pueden mejorar la digestión de los nutrientes, aprovechar su valor nutritivo, sin alterar el funcionamiento ruminal, produciendo menos gases de efecto invernadero (GEI).

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el impacto de la adición de la Microalga *Schizochytrium* y aceite de girasol en la dieta balanceada de la alimentación de los Becerros

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7.2.1. PRIMER OBJETIVO:

Evaluar la producción de gas y cinética de la fermentación ruminal *in vitro* de una dieta balanceada en la alimentación en becerros.

7.2.2. SEGUNDO OBJETIVO:

Determinar la producción de gas metano y dióxido de carbono en la cinética ruminal *in vitro* en una dieta balanceada en la alimentación en becerros.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. SUSTRATO Y TRATAMIENTOS

Se preparó una ración total mezclada (TMR), por sus siglas en Inglés como sustrato para contener 400 g de heno de alfalfa (*Medicago sativa*), 250 g de maíz amarillo molido, 250 g harina de soya, y 100 g de salvado de trigo. La composición química del TMR fue de 880 g MS (base en peso húmedo), 934 g de materia orgánica (OM), 218 g de proteína bruta (CP), 219 g de fibra detergente neutro (NDF) y 201 g Fibra detergente ácida (ADF). El TMR sin aditivo se consideró como tratamiento control. La microalga *Schizochytrium* (Xuhuang Bio-Tech Co., Ltd, Shaanxi, China) y OFS obtenida de un proveedor local, fueron individualmente añadidas a una mezcla a 1: 1 en base seca (SASO) la TMR en niveles de 1, 2, 3, 4, y 5% sobre la base de DM. Los ácidos grasos individuales (g / 100 g de ácidos grasos totales) del aceite fueron: 5.4 g, C16:0; 4.6 g, C18:0; 21.0 g, C18:1 y 69.0 g, C18:2.

8.2. FERMENTACIÓN IN VITRO Y BIODEGRADACIÓN

El inóculo se obtiene del rumen de 2 becerros Holstein (450 ± 20 kg PV) canulados en el rumen, alojados en corrales individuales y alimentados con una dieta que consta de heno de avena y concentrado (Purina[®], Toluca, México) en relación 60:40 *ad libitum*, con acceso libre al agua. Los animales se alimentaron dos veces al día a las 08:00 y 16:00 h y se manejaron bajo las condiciones estipuladas en la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El contenido del rumen se colocó en un termo plástico precalentado a 39 ° C, se transportó al laboratorio donde se purgó con CO₂, se mezcla y filtra a través de cuatro capas de gasa en un matraz con O₂ exento de free headspace (espacio entre el líquido y la tapa). El contenido del rumen se mantuvo a una temperatura de 39 ° C con un flujo continuo de CO₂.

Antes del proceso de incubación, el medio de incubación que contenía soluciones amortiguadoras, macrominerales, microminerales y resarzurina y agua destilada se

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

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

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

Después de 48 h de incubación, se tomaron 5 ml de gas y se almacenaron en viales con solución salina saturada preparada con 400 g de NaCl en 1L de agua destilada y se añadió el pH ajustado a 2 y 5 ml de naranja de metilo al 20% como indicador para determinar la concentración del CH₄ y CO₂. La solución salina saturada previamente preparada se almacenó en viales serológicos de 60 ml sin free

headspace y tapones de neopreno colocados y sellados con anillos de aluminio, y almacenados lejos de la luz. Para la determinación de CH₄ y CO₂, una muestra de 10L de la fase gaseosa se tomó de los viales con solución salina saturada y se inyecta en un 500 cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Claurus (Ciudad de México, México) con un detector de ionización de llama y helio como el gas portador. Se utilizó un detector de conductividad térmica con las temperaturas de horno, columna y TCD fijadas a 80°C, 170°C y 130°C, respectivamente. Los tiempos de retención fueron de 0,73 min y 1,05 min para CH₄ y CO₂, respectivamente.

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

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

8.3. TOTAL DE BACTERIAS Y PROTOZOARIOS

Se determinó la concentración de bacterias totales después de 48 h de incubación utilizando una cámara de conteo de bacterias Petroff-Hausser (Hausser Scientific[®], 3900, Horsham, PA) y un microscopio de contraste de fases (Olympus[®], BX51, Ciudad de México, México) con una ampliación de 100X. Se tomaron exactamente 0,5 ml de la muestra de medio fijado al 10% de formaldehído y se diluyó en 4,5 mL de agua destilada. La concentración de bacterias/mL se determinó como el promedio de las bacterias observada en cada rejilla, multiplicado por el factor de dilución y el factor de cámara (2×10^7), de acuerdo con la siguiente fórmula: Número de bacterias/mL = $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$

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

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

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

8.4. ANÁLISIS QUÍMICOS

Se analizaron muestras de TMR y microalgas para DM (# 934.01), ceniza (# 942.05), nitrógeno (# 954.01) y extracto etéreo (# 920.39) según AOAC (1997). La TMR se analizaron para la FDN, FDA y lignina (AOAC, 1997; # 973.18) (Van Soest et al., 1991) utilizando un ANKOM²⁰⁰ Unidad de fibra Analyzer (ANKOM Technology Corp., Macedonia, Nueva York, EE.UU.) con el uso de Una alfa-amilasa y sulfito sódico.

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

La concentración de Nitrógeno amoniacal ruminal se determinó según el método de Broderick y Kang (1980). Muestra del medio de incubación se centrifugaron a 3000 g durante 10 min, y 20L del sobrenadante se mezcló con 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito y la mezcla se incubó a 39 ° C durante 30 min y después se diluyó con 5 mL De agua destilada. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible (Varian, modelo Cary 1E, California, EE.UU.) a 630 nm. La concentración mg / dL resultante se dividió por el factor 0,8, que es el factor de dilución de ácido metafosfórico al 25%.

8.5. CÁLCULOS

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

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

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

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

$$(2) ME = 2,20 + 0,136 PG \text{ (ml / 0,5 g DM)} + 0,057 CP \text{ (g / kg de DM)}$$

$$(3) OMD = 148,8 + 8,89 PG + 4,5 CP \text{ (g / kg DM)} + 0,651 \text{ cenizas (g / kg DM)}$$

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

El factor de partición a las 24 h de incubación (PF_{24} , una medida de la eficiencia de fermentación) se calculó como la relación de degradabilidad de la MS *in vitro* (mg) para el volumen (ml) de PG a las 24 h (es decir, DMD / PG total (PG_{24})) de acuerdo con Blummel *et al.* (1997). El rendimiento de gas (GY_{24}) se calculó como el volumen de gas (mL gas / g MS) producida después de 24h de incubación, dividido por la cantidad de DMD (g) como:

$$(4) GY =_{24} \text{ ml de gas / g MS / g DMD}$$

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

$$(5) AGCC \text{ (mmol / 200 mg de DM)} = 0,0222 GP - 0,00425$$

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

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

$$(6) \text{ MCP (mg / g DM) = miligramos DMD - (mL gas} \times 2,2 \text{ mg / mL)}$$

Donde el 2,2 mg / mL es un factor estequiométrico que expresa mg de C, H y O requeridos para el gas SCFA asociado con la producción de 1 mL de gas (Blummel *et al.*, 1997).

8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

9. REFERENCIAS

- Abecia, L., Martin-Garcia, A. I., Martinez, G., Tomkins, N.W., Newbold, C.J. y Yañez-Ruiz, D.R. 2011. Manipulation of the rumen microbial ecosystem to reduce methane emissions in ruminants through the intervention at early life stage of pre-ruminants and their mothers. *Adv. Anim. Biosci.* 2: 271.
- Abu Bakr, AR, Alimon, AR, Yaakub, H., Abdullah, N., Ivan, M., 2013. La digestibilidad, protozoos del rumen, y la fermentación ruminal en cabras recibieron aceite de palma en la dieta de los subproductos. *Revista de la Sociedad de Ciencias Agrícolas Arabia*, 12 (2), 147-154.
- Aderinboye, RY, Akinlolu, AO, Adeleke, MA, Najeem, GO, Ojo, VOA, Isah, OA, Babayemi, DO, 2016. La producción de gas in vitro y la degradación de la materia seca de cuatro hojas de exploración utilizando vacas, ovejas y cabras inóculos. *Eslovaca Journal of Animal Science*, 49 (1), 32-43.
- Angeles, S. 2000. Fermentación, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas de lechería. (On line) <<http://www.fmvz.mx/bovinotecnia/BtRgZooG014.pdf>> (15 Jun 2009).
- Angenent, L.T.; K. Karim; M. H. Aldahlan; B. A. Wrenn & R. Domíquez-Espinosa. 2004. Production of bioenergy and biochemical from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.*, 22: 477-485. <http://angenent.bee.cornell.edu/research/TIBTECH-04.pdf>
- Araujo, O. y Vergara, J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. *Arch. Latinoam.* Vol. 15.

- Blummel, M., Steingss, H., Becker, K., 1997. La relación entre la producción de gas in vitro, la producción de biomasa microbiana in vitro y 15 N incorporación y sus implicaciones para la predicción del consumo voluntario de forrajes. *Br. J. Nutr.* 77, 911-921.
- Boeckert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., Fievez, V., 2007. examen in vitro de algas micro-DHA comestible: 1. Efecto sobre la lipólisis rumen y la biohidrogenación de ácido linoleico y linolénico. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136 (1), 63-79.
- Broderick, G.A., Kang, J.H., 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy Sci.* 63, 64–75.
- Burnett, VF, Jacobs, JL, Norng, S., Ponnampalam, ES, 2017. consumo de alimento, ganancia de peso y características de la canal de corderos ofrecidos sedimentaron heno pradera anual complementado con semillas de lino (*Linum usitatissimum*) copos o algas (*Schizochytrium* sp.). *Anim. Pinchar. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1071/AN15230>
- Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de especialización FEDNA, Madrid, 6 y 7 de noviembre 1997.
- Calsamiglia, S. y Ferret, A. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: Acidosis y meteorismo. XVIII Curso de especialización FEDNA. Barcelona, 4 y 5 de Noviembre de 2002

- Cheng K.J., Lee S.S., Bae H.D., and Ha J.K. (1999). Industrial applications of rumen microbes. *Asian-Australian. J. Anim. Sci.* 12: 84-92.
- Chesson, A. y Forsberg, C.W. (1997) En: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2º ed. Hobson, P. y Stewart, C. (Eds.). Chapman & Hall Ltd, Andover, UK.
- Church CD, 1988: El Rumiente, Fisiología digestiva y nutrición. Edición en lengua española 1993. Editorial Acribia, S.A.
- Das, H. & S. K. Singh. 2004. Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry- a critical appraisal. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 44: 77-89.
- Elghandour, PP, Kholif, AE, Salem, AZM, de Oca, RM, Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, OA, 2016. Dirigiéndose a metano y dióxido de carbono ruminales sostenibles de cascarilla de soja por sales de ácidos orgánicos. *J. Limpio. Pinchar.* 135, 194-200.
- Elghandour, PP, Vázquez, JC, Salem, AZM, Kholif, AE, Cipriano, MM, Camacho, LM, Márquez, O., 2017. In vitro de producción de gas y metano de dos raciones mixtas influenciados por tres diferentes cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* 45: 1, 389-395
- Fébel, H. y Fekete, S. 1996. Factors influencing microbial growth and the efficiency of microbial protein synthesis: a review. *Acta Veterinaria Hungarica.* 44(1): 39-56.
- Forsberg, C.W. y Cheng, K.-J. (1992). En: *Biotechnology and Nutrition*. Bills, D.D. y Kung, S.D. (Eds.). Butterworth Heinemann, Stoneham. pp. 107-147.

- Goering, MK, Van Soest, PJ, 1970. Análisis de forraje de fibra (aparatos, reactivos, procedimientos y algunas aplicaciones). Manual para la agricultura, n 379. Servicio de Investigación Agrícola, USDA, Washington, DC.
- Hamer, G. 2003. Solid waste treatment and disposal: Effects on public health and environmental safety. *Biotechnol. Adv.*, 22: 71-79.
- Haigh, M. 2005. Assessing the environmental burdens of anaerobic digestion in comparison to alternative options for managing the biodegradable fraction of municipal solid wastes. *Water. Sci. Technol.*, 52: 553-559
- Hook, SE, Wright, ADG, McBride, BW, 2010. Los metanógenos: productores de metano de las estrategias del rumen y mitigación. *Arqueas*, 2010. Número de artículo 945785, 11 páginas; doi: 10.1155 / 2010/945785.
- Johnson, KA, Johnson, DE, 1995. Las emisiones de metano del ganado. *J. Anim. Sci.* 73, 2483-2492.
- Jung H.G., Ralph J., and Hatfield R.D. (1991). Degradability of phenolic acid-hemicellulose esters: A model system. *J. Sci. Food Agric.* 56: 469-478.
- Kholif, AE, Morsy, TA, Abd El Tawad, AM, Anele, UY, Galyean, ML, 2016. Efecto de la suplementación de dietas de cabras Anglo-Nubian con soja y aceites de linaza en la composición de la leche. *J. Agric. Food Chem.* 64, 6.163 a 6.170.
- Kholif, A., Morsy, T., Matloup, O., Anele, U., Mohamed, A., El-Sayed, AB, 2017B. Dietética *Chlorella vulgaris* microalgas mejora la utilización del

pienso, la producción de leche y las concentraciones de ácidos linoleicos conjugados en la leche de cabras Damasco. *J. Agr. Sci.* DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859616000824>.

- Krausen, K. Combs, D. Y Beauchemint, K. 2002. Effects of Forage Particle Size and Grain Fermentability in Midlactation Cows. II. Ruminant pH and Chewing Activity. *Journal of Dairy Science*. 85 (8): 1947–1957.
- Ladisch, M. R.; K. W. LIN; M. Voloch & G. T. Tsao. 1990. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Tech.* 15: 90-99
- McDonald, P. Edwards, R. Greenhalgh, J y Morgan, C. 1995. *Nutrición animal* 5ª edición. Zaragoza, España. Acribia S.A. 145-147 p.
- Menke, KH, Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. La estimación de la digestibilidad y contenido de energía metabolizable de los alimentos para la alimentación de rumiantes de la producción de gas cuando se incuban con licor de rumen in vitro. *J. Agr. Sci., Cambridge.*, 93, 217-222
- Morsy, TA, Kholif, SM, Kholif, AE, Matloup, OH, Salem, AZM, El ella, AA, 2015. Influencia de girasol semillas enteras o aceite sobre la fermentación ruminal, la producción de leche, la composición y el perfil de ácidos grasos en hembras en lactación. *Australas asiático. J. Anim. Sci.* 28, 1116-1122.
- Relling, A. Y Mattioli, G. 2003. *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes.* (On line). Universidad Nacional de La Plata. La Plata. <

<http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catbioquimicavet/fisio%20dig%20rumiantes.pdf>> (15 jun 2009)

- Roderick, M. y White, B. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *Journal Dairy Science* 73(10): 2971-2995.
- Tricarico, J. M.; J. D. Johnston; K. A. Dawson; K. C. Hanson; K.R. Mcleod & D. L. Harmon. 2005. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. *Anim. Sci.*, 81: 365-374.
- Weimer, P. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *Journal Animal Science*. 76(12): 3114-3122.

ANEXO ARTÍCULO

Influence of sunflower oil and *Schizochytrium* microalgae on ruminal methane and carbon dioxide emissions of total mixed ration in steers

Abstract

The sustainable mitigation of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) emissions as well as ruminal fermentation kinetics of a total mixed ration (TMR) in the presence of *Schizochytrium* microalgae (SMA) and sunflower oil (SFO) or their mixture (1:1 dry matter (DM) basis; SASO) as unsaturated fatty acid sources was investigated. The TMR contained 218 g crude protein, 219 g neutral detergent fiber. All the additives were tested at (/g DM substrate): 0, 10, 20, 30, 40, and 50 mg rumen liquor from two rumen cannulated Holstein steers. Interactions between inoculum source × additive type, and inoculum source × additive type × dose were observed ($P < 0.05$) for gas, CH₄ and CO₂ production and fermentation parameters. Methane production and fermentation kinetics differed ($P < 0.05$) between the inoculums used. Additives affected ($P < 0.05$) the fermentation kinetics in a dose-dependent manner. The inclusion of SFO at 1, 2, 4, and 5%, SMA at 2, 3 and 5% and SASO at 1 and 3% increased ($P < 0.01$) gas production (GP) and decreased ($P < 0.05$) GP rate, while using steer inoculums, SFO at 1 and 4% increased ($P < 0.01$) GP and GP rate. All levels of SMA and SASO decreased the asymptotic GP and increased the GP rate. Whereas the steer inoculums decreased ($P < 0.01$) CH₄ production at all levels of SFO, SMA and SASO. The feed additives can be used to improve feed utilization, and to reduce GHG production. There are no recommendations for using SMA or SASO in steer nutrition. Therefore,

Schizochytrium microalgae and sunflower oil could be a valuable means of sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions and improvement of the environmental conditions.

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

1. Introduction

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

The inclusion of lipids in the diets of ruminants is thought to be a good strategy for reducing GHG production from ruminants (Hook et al., 2010), through the decrease in ruminal protozoal (Abubaker et al., 2013) numbers in the rumen. Moreover, the inclusion of dietary lipids rich in docosahexaenoic acid (DHA) can enhance the nutritive value of the end product of ruminant production (e.g., milk and meat), and improve animal performance (Kholif et al., 2016). Docosahexaenoic acid is a ω -3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) that can be used as a strategy to enrich milk and meat with the DHA fatty acids, with several

beneficial effects on human health. Vegetable oils and microalgae are rich sources of unsaturated fatty acids (UFA) including DHA and conjugated linoleic acid (CLA) fatty acids.

Addition of vegetable oils to the rations of lactating animals is a strategy that alters the proportion of saturated (SFA) and UFA in animal products through extensive ruminal biohydrogenation (Kholif et al., 2016). Sunflower oil (SFO) is a rich source of linoleic acid, and may increase CLA in the animal product (Morsy et al., 2015). Morsy et al. (2015) and Kholif et al. (2016) observed that feeding vegetable oils modified the fatty acid profile without negative effects in ruminal fermentation or nutrients digestibility.

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

Different ruminant species have different comparative ability to digest feeds (Aderinboye et al., 2016). Therefore, examining the probable differences in the fermentative capacity of the microbial populations in steers offered the same diet and fermentation conditions is important. The present experiment aimed to study the effect of including SFO and/or SMA

as UFA sources on in vitro ruminal fermentation and the sustainable mitigation of CH₄ and CO₂ emissions, as means of improving environmental conditions, using rumen inoculums from steers fed the same diet. The hypothesis was that differences among ruminant species and different sources of dietary fats will alter ruminal microflora making some changes in the ruminal microflora, resulting in improved dietary nutritive value and decreased GHG production.

2. Materials and methods

2.1. Substrate and treatments

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

Table 1

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

The individual fatty acids (g/100 g total fatty acids) of the oil were: 5.4 g, C16:0; 4.6 g, C18:0; 21.0 g, C18:1 and 69.0 g, C18:2.

2.2. In vitro fermentation and biodegradation

The inoculum was collected from two cannulated rumen Holstein steers (450±20 kg LW), housed in individual pens and fed a diet consisting of oat hay and concentrate (PURINA®, Toluca, Mexico) at 60:40 ratio *ad libitum*, with free access to water. Animals were fed twice daily at 08:00 and 16:00 h, and managed under the conditions stated in the Official Mexican Standard of technical specifications for the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Rumen contents were placed in a preheated plastic thermostat 39°C, and transported to the laboratory where it was flushed with CO₂, mixed and strained through four layers of cheesecloth into an O₂-free headspace flask. The rumen content was maintained at a temperature of 39°C with continuous flow of CO₂.

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

Samples (0.5 g) of the substrate were weighed into 120 mL serum bottles with appropriate addition of additives (i.e., SMA, SFO or a mixture of SMA and SFO)/g DM, where, 50 mL of previously prepared rumen liquor and the buffer were added. Bottles were maintained at constant CO₂ flow for 30 sec, capped with neoprene plugs and sealed with aluminum rings. Vials were placed in an incubator (Riossa®, F-51 D, Estado de México,

México) at 39°C for 48 h. Additionally, three bottles used as blanks (rumen fluid only) were incubated for 48 h. Three incubation runs were performed in three weeks.

Readings of GP were performed at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 h of incubation. A water displacement apparatus was used according to Fedorak and Hrudey (1983), made out using a universal support, with a conical funnel, a 100 mL burette and two latex hoses attached, having 0.5 and 1 m in length and 3/8-inch diameter. Vials were punctured with a 16-gauge needle and placed at the end of the hose and the volume of GP (mL) was measured by the displacement of water in the burette.

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

At the end of 48h incubation, the fermentation process was stopped by swirling the bottles in ice for 5 minutes, the bottles were uncapped and the pH was measured immediately

using a pH meter (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, USA). The contents of the bottles were filtered into Ankom® Technologies F57 bags (at constant weight), with the aid of a filtration system connected to a vacuum pump. Bottles were rinsed with hot water three times to ensure recovery of all the fermentation residue. Bags were then dried in a forced air oven set at 55°C for 48 h. Dry matter degradation was calculated by the difference in weight between the initial dried substrate and the dried residue.

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

2.3. Total bacteria and protozoa count

The concentration of total bacteria was determined after 48 h of incubation using a count chamber bacterium Petroff-Hausser (Hausser Scientific®, 3900, Horsham, PA) and a phase contrast microscope (Olympus®, BX51, Mexico City, Mexico) at 100x. An exact volume of 0.5 mL of the 10% formaldehyde fixed medium sample was taken and diluted in 4.5 mL of distilled water. The concentration of bacteria per mL was determined as the average of bacteria observed in each grid, multiplied by the dilution factor and the chamber factor (2×10^7), according to the following formula: $\text{Bacterial number/mL} = \mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$

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

For the protozoal count, 1 mL of the 10% formaldehyde fixed sample was obtained and diluted in 1 mL of distilled water, then 0.5 mL of the mixture was taken with a Pasteur pipette (BRAND, 7712, Wertheim, Germany) and deposited into a Neubauer chamber (BRAND, 7178-10, Wertheim, Germany), subsequently observed on a contrast microscope (Carl Zeiss®, Axiostar, Mexico City, Mexico) at 400X magnification. The protozoa count was made in eight quadrants (4 per grid), taking as viable protozoa those that maintained their morphological integrity. The concentration of protozoa per mL of culture medium was estimated as the average of protozoa observed in each grid, multiplied by the dilution factor and the chamber factor (1×10^4), according to the formula: Protozoal number = $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 10^4$

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

2.4. Chemical analyses

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

The fatty acids (method ID: GB 5413.27–2010) and amino acids (analysis method ID: GB/ T 5009·124-2003) of SMA were determined according to the Chinese national standard methods (National Standards of People's Republic of China 2010) analysis as provided by the manufacturer. Samples of SFO were analyzed for fatty acids content according to the method of AOAC (1997) using fatty acids methyl esters prepared by base-catalyzed methanolysis of the glycerides. The fatty acids were separated on a Perkin-Elmer chromatograph (model 8420, Beaconsfield, Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) equipped with a flame ionization detector. Helium was the carrier gas at 30 cm/sec and column temperature was initially 150°C for 1 min, and increased by 4°C/min up to 200°C, where it was held at 200°C for 10 min. Individual fatty acids methyl esters were identified by retention time using as reference methyl esters standards.

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

2.4. Calculations

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

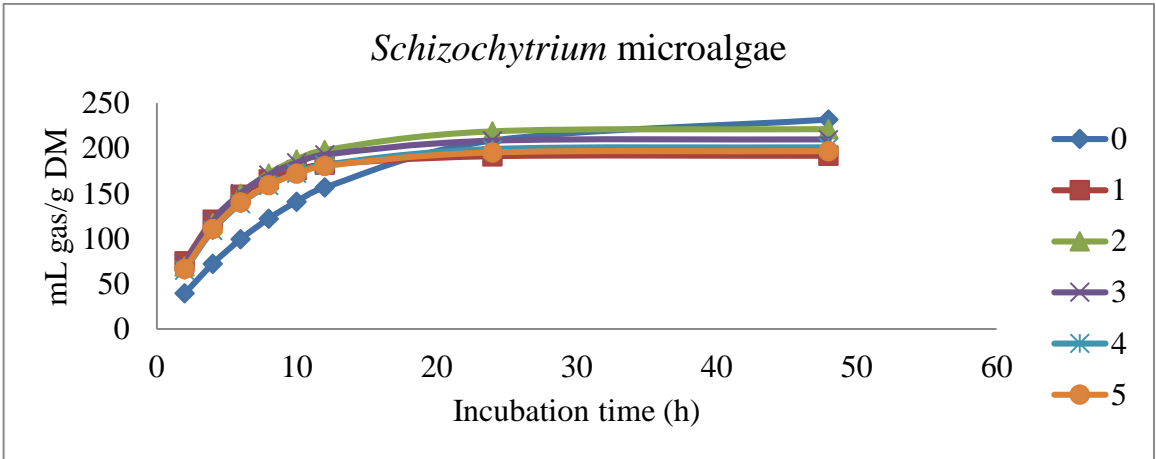
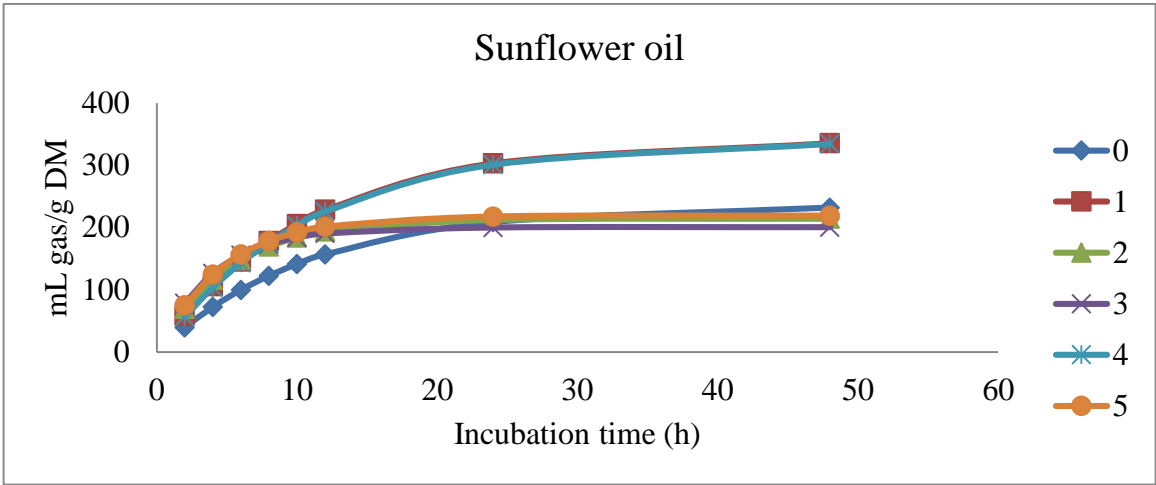
where the 2.2 mg/mL is a stoichiometric factor that expresses mg of C, H and O required for the SCFA gas associated with production of 1 mL of gas (Blümmel et al., 1997).

2.5. Statistical analyses

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

3. Results

3.1. Gas production



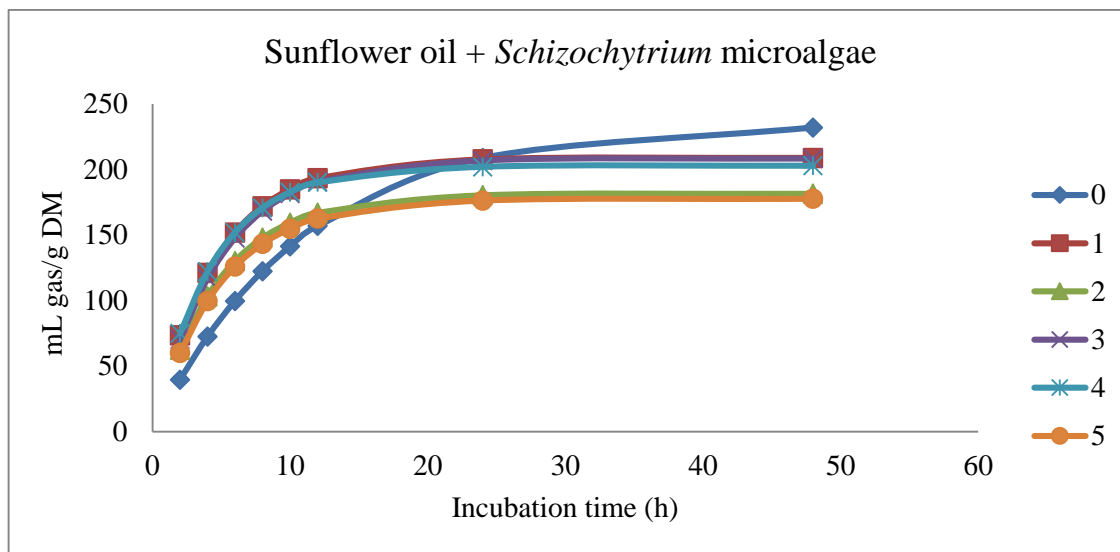


Fig 1.

In vitro gas production (mL/g incubated DM) of the total mixed ration incubated with inoculums from steers with the addition of sunflower oil, *Schizochytrium* microalgae or their mixture(1:2 DM basis) at five different levels.

Fig. 1 shows the *in vitro* GP of the incubated substrate using different additives and inoculums from steers. Inoculum source × additive type, and inoculum source × additive type × dose interactions were observed ($P < 0.05$) for GP, CH₄ and CO₂ production (Table 2).

Table 2

In vitro biogas production (mL/g DM) of a total mixed ration affected by the addition of sunflower oil, *Schizochytrium* microalgae or their mixture at 1:2 DM basis using rumen liquor from steers

Additive	Dose	Gas production parameters ¹				CH ₄ production at 48 h of incubation			CO ₂ production at 48 h of incubation			
		<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	mL gas/g degraded DM	CH ₄ production	Proportional CH ₄ production	mL CH ₄ /g degraded DM	CO ₂ production	Proportional CO ₂ production	mL CO ₂ /g degraded DM	
Control	0	235	0.093	2.12	340	204	87.9	299	28.0	12.1	41.0	
Sunflower oil	1	339	0.093	1.51	437	286	85.1	373	49.8	14.9	64.8	
	2	214	0.196	1.75	281	181	84.7	238	32.7	15.3	43.0	
	3	201	0.250	1.84	271	167	83.4	226	33.2	16.6	44.9	
	4	339	0.091	1.79	433	272	81.4	353	62.1	18.6	80.5	
	5	219	0.210	1.79	289	176	80.3	232	43.0	19.7	56.9	
<i>Schizochytrium</i> microalgae	1	192	0.249	1.84	257	168	87.4	225	24.1	12.6	32.1	
	2	221	0.189	1.73	290	189	85.6	248	31.9	14.4	41.7	
	3	210	0.210	1.77	285	180	85.9	245	29.7	14.1	40.3	
	4	201	0.197	1.64	269	173	86.1	231	28.0	13.9	37.6	
	5	197	0.207	1.79	254	169	85.9	218	27.9	14.1	36.0	
Sunflower + <i>Schizochytrium</i> microalgae	1	209	0.217	1.81	274	180	86.0	235	29.2	14.0	38.3	
	2	182	0.211	1.51	240	156	86.0	206	25.5	14.0	33.8	
	3	208	0.206	1.80	271	178	85.6	232	30.0	14.4	39.0	
	4	203	0.231	1.83	264	178	87.9	232	24.7	12.1	32.2	
	5	178	0.207	1.45	232	156	87.7	204	21.7	12.3	28.4	
SEM		8.0	0.0047	0.137	12.2	7.3	1.166	11.5	3.05	1.16	4.05	
Additive		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.443	<0.001	0.004	0.443	0.005	
Linear		<0.001	<0.001	0.067	<0.001	<0.001	0.122	<0.001	0.537	0.224	0.521	
Quadratic		<0.001	<0.001	<0.001	0.053	0.001	0.743	0.104	0.045	0.758	0.208	
<i>P</i> value												
Additive			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.326	<0.001	<0.001	0.324	<0.001
Dose												
Linear			0.156	<0.001	0.615	<0.001	0.101	0.561	<0.001	0.709	0.549	0.054
Quadratic			<0.001	<0.001	<0.001	0.022	<0.001	0.080	0.007	0.535	0.082	0.455

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

The GP, CH₄ and CO₂ production rates (mL/g degraded DM) were different between the inoculums. Additive types ($P<0.001$) and additive doses affected GP, CH₄ and CO₂ production (quadratic effect, $P<0.001$). The steer inoculums at 1 and 4% of SFO doses increased the asymptotic GP and the rate of GP (linear and quadratic effects, $P<0.001$), while all levels of SMA and SASO treatments decreased the asymptotic GP and increased the rate of GP. All doses of additives linearly decreased ($P<0.001$) lag time of GP with the steers' inoculums.

The steers' inoculums, SFO at 2, 3 and 5%, and all levels of both SMA and SASO decreased CH₄ production (linear and quadratic effects, $P\leq 0.001$) as mL/g DM incubated substrate, without affecting the proportional CH₄ production. The levels 3 and 5% of SFO

increased CO₂ production as mL/g DM incubated substrate without affecting the proportional CO₂ production and CO₂ production as mL/g DM incubated substrate.

3.2. Ruminal bacteria and protozoa

There was no inoculums source × additive type or inoculums source × additive type × dose interactions observed ($P>0.05$) for bacterial and protozoal counts (Table 3).

Table 3

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

Additive	Dose	pH	SCFA	Ammonia-N	DMD	OMD	ME	Total bacteria × 10 ⁸	Total protozoa × 10 ⁵
Control	0	6.96	4.61	55.7	683	622	9.12	4.26	6.23
Sunflower oil	1	6.52	6.71	62.3	767	790	11.69	12.22	3.05
	2	6.51	4.69	61.3	761	628	9.21	11.82	4.20
	3	6.47	4.42	65.6	740	607	8.88	10.72	3.24
	4	6.47	6.66	62.9	772	786	11.63	7.57	4.35
	5	6.47	4.81	62.2	757	638	9.36	8.95	4.06
<i>Schizochytrium</i> microalgae	1	6.47	4.23	63.0	748	592	8.65	7.45	2.28
	2	6.47	4.84	61.7	764	641	9.40	6.13	4.76
	3	6.50	4.61	61.8	737	622	9.12	8.10	2.95
	4	6.49	4.40	70.0	749	606	8.86	8.13	4.71
	5	6.48	4.32	65.5	776	599	8.77	9.88	2.54
Sunflower + <i>Schizochytrium</i> microalgae	1	6.47	4.59	57.9	763	620	9.09	7.22	3.08
	2	6.42	3.98	59.0	756	572	8.35	11.05	3.30
	3	6.49	4.57	58.5	768	619	9.07	9.00	3.15
	4	6.45	4.46	61.5	767	610	8.94	11.50	3.53
	5	6.41	3.89	60.6	766	565	8.24	10.08	4.38
SEM		0.016	0.139	1.03	9.6	11.1	0.170	1.718	0.541
Additive		0.002	<0.001	<0.001	0.038	<0.001	<0.001	0.006	0.049
Linear		<0.001	0.338	<0.001	<0.001	0.340	0.347	0.561	0.854
Quadratic		<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	0.023	0.003

Additive	<0.00 1	<0.00 1	<0.001	0.8433	0.027
Linear	<0.00 1	<0.00 1	<0.001	<0.00 1	0.003
Quadratic	<0.00 1	<0.00 1	<0.001	<0.00 1	0.881

¹pH ruminal pH, DMD dry matter degradability (mg/g DM), SCFA short-chain fatty acids (mmol/g DM), OMD in vitro organic matter digestibility (g/kg DM), ME metabolizable energy (MJ/kg DM)

Both inoculums sources and additives at all doses quadratically decreased ($P=0.003$) total protozoal counts and linearly increased ($P=0.002$) total bacterial counts

3.3. Fermentation kinetics

Inoculum source \times additive type and inoculums source \times additive type \times dose interactions were observed for fermentation SCFA, ammonia-N, OMD, ME, PF₂₄, GY₂₄, and MCP (Table 3). Inoculum source altered the pH, SCFA, OMD, ME, PF₂₄, GY₂₄, and MCP of the incubation medium. Both inoculums sources and additives at all doses decreased (linear and quadratic effects, $P<0.001$) fermentation pH and increased ammonia-N ($P<0.001$), and DMD ($P<0.05$). The inoculums from steers at levels 1, 4 and 5% of SFO and 2% of SMA quadratically increased ($P\leq 0.003$) SCFA, OMD, ME, GY₂₄, and MCP but decreased ($P=0.001$) PF₂₄. All levels of SASO quadratically decreased ($P\leq 0.003$) SCFA, OMD, ME, GY₂₄, and MCP but increased ($P=0.001$) PF₂₄.

4. Discussion

The occurrence of interactions between inoculum source \times additive type, and inoculums source \times additive type \times dose evidence that the effect of each additive will be

inoculums- and dose-dependent. Therefore, the discussion will be based on the effect of each feed additive at different doses with both rumen inoculums sources.

4.1. Gas production

Using rumen fluid from different ruminant species to inoculate the in vitro incubation cultures is a useful tool to examine possible differences in the ruminal microbial population and the digestive capacity of each ruminant species. In the present experiment, the rate of GP was higher for steer inoculums.

SFO only caused the same effect with goat inoculums at two levels (i.e., 1 and 4%). The reasons for these difference between inoculums from steers are unclear, however, the differences in lipid metabolism among ruminant species (Chilliard et al. 2003) is a probable reason. It was expected that increasing the level of SFO would disturb fermentation and digestion activities of the TMR due to the anti-microbial effect of UFA of the oil. The results from the current study reveal that the inclusion of SFO up to 4 and 5% of the diet did not affect negatively ruminal fermentation. In agreement to results of the current study, Narimani-Rad et al. (2011) observed a positive effect with the inclusion of SFO at 2.5% to a concentrate-based diet containing alfalfa forage and barley grain at 40:60, and a negative effect on GP at 5% of SFO inclusion. Furthermore, Narimani-Rad et al. (2012) observed lack of effect on GP or rate of GP with the inclusion of SFO at the same levels with forage-based diets. This variation maybe due to the different substrates used. Sunflower oil inclusion to a

forage-based diet may have coated feed particles and therefore decrease the attachment of ruminal microbes resulting in similar fermentation patterns (Narimani-Rad et al., 2012).

The in vitro results of micro-algae supplementation appear promising (Kholif et al., 2017b), however, further in vivo studies are required to elucidate the optimum dose in ruminants in terms of effects on feed nutritive value and CH₄ production. *Schizochytrium* microalgae alone or with SFO added (i.e., SASO treatment) negatively affected GP with steer inoculums revealing negative effects on steers' nutrition. More research is required to elucidate the effect of SMA on feed utilization in steers. This difference is another indicator about different microbial profile in steers. Because of the negative effect of SMA at most doses on measured parameters, only the negative effect on ruminal fermentation will be discussed. It is well documented that most species of microalgae contain some antioxidative, antimicrobial or compounds with cytotoxic effects (Scholz and Liebezeit, 2012), which may have negatively affected GP. In addition, the contents of long chain fatty acids in SMA may have a negative effect on feed digestion and fermentation (Burnett et al., 2017). The negative effect of long chain fatty acids on ruminal fermentation was also reported by Beauchemin et al. (2007).

4.2. Greenhouse gas production

The different effects of rumen inoculums on CH₄ and fermentation parameters may be due to different bacterial and protozoal populations and microbial activity in steers (Aderinboye et al., 2016). Hook et al. (2010) reported that CH₄ production varies based on

the ruminant species because the protozoal population varies from animal-to-animal despite feeding the same diets (Boeckaert et al., 2007). Because ruminal microbial populations depend mainly on the type of diet fed, and since both steers were maintained on the same diet, microbial species were not expected to vary (Mould et al., 2005). Mould et al. (2005) reported that other factors could produce some variations in inoculums including host animal effects, sampling time and source, as well as sample preparation and inoculation. Ammar et al. (2004) reported that differences in dentition, chewing/eating behavior, gut physiology, compartment dimensions and retention time would influence gut microflora. Thus, variations in CH₄ production and fermentation kinetics between steers rumen fluid indicates that only one species cannot be used to predict CH₄ production and fermentation profile of feeds (Bueno et al., 2005; Aderinboye et al., 2016), and wherever possible the inoculums should be obtained from an appropriate host animal.

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

(Beauchemin et al., 2008). In the present experiment, SFO, SMA and SASO decreased proportional CH₄. This result was expected based on the well-documented theory that dietary lipids can be used as an option to reduce methanogenic archaea, due to their ability to inhibit ruminal protozoa (Hook et al., 2010). Diets high in UFA undergo ruminal biohydrogenation, which forms an alternative H₂ sink to methanogenesis (Johnson and Johnson, 1995). Reduction of H₂ accumulation in the rumen by addition of UFA seems to be a promising procedure to reduce rumen CH₄ production. Fatty acids can bind to the cell membrane and interrupt membrane transport (Dohme et al., 2001). Suppression of ruminal methanogenesis with dietary lipids depends mainly on the degree of instauration of the fatty acids, where sources rich in long chain fatty acids inhibit ruminal cellulolytic microbes to a higher degree than SCFA (Meale et al., 2012). This can explain the varied responses between SFO and SMA.

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

The experimental diet, and the type of lipid used account for varying effects of lipids on methane abatement (Hook et al., 2010). Beauchemin et al. (2007) reported 11.5-22.0% reduction in methanogenesis with the inclusion of SFO in the diet of cows.

4.3. Ruminal bacteria and protozoa

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

Sunflower oil and SMA increased total bacterial counts and MCP production suggesting an increase in the availability of energy for microbial growth. Boeckaert et al. (2007) observed that feeding SMA shifted ruminal bacteria toward cellulolytic population instead of amylolytic bacteria in the rumen of SMA-fed dairy cow. The decreased count of protozoa can be the reason for increased bacterial number because protozoa engulf rumen bacteria cell up to 20,000 cells per hour (Dehority, 2003), therefore, bacterial cell number could be multiplied after protozoal decline.

4.4. Fermentation kinetics

The feed additives improved fermentation kinetics in a dose-dependent manner. Both of SFO and SMA decreased fermentation pH. However, the reported values of fermentation pH were within the range of 6.38 to 6.49, which is above the values that might negatively have affected ruminal function (de Veth and Kolver, 2001). The reported values indicate a normal ruminal fermentation environment for the culture medium. The lower ruminal pH may be related to the increased concentration of ammonia and total SCFA observed with the additive supplementation (Sucu et al., 2017), or due to increased energy density (Morsy et al., 2015) in the diets. The increased total SCFA production and decreased pH reflect a higher extent of fermentation with the inclusion of SFO and SMA. The greater SCFA and ME were a result of improved fermentation and OMD with the additives, and may be due to improved synchronization between energy and N release in the ruminal medium. Sunflower oil and SMA increased ammonia-N, which may be due to the increased bacterial count with the inclusion of SFO and SMA, and by the presence of soybean meal as the main protein source in the TMR. The enhanced microbial activity and nutrients degradation due to increased total ruminal bacterial numbers, in response to the inclusion of SFO and SMA in the diet is usually linked to an increase in SCFA production (Morsy et al., 2015; Sucu et al., 2017). Ueda et al. (2003) observed that the inclusion of flaxseed oil increased ruminal ammonia concentration in dairy cows due to increasing bacterial N flow with SFO.

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

These improved fermentation kinetics as OMD, ME, GY₂₄, and MCP in steer inoculums do not support the often stated superiority in terms of nutrients digestibility (Domingue et al., 1991).

5. Conclusion

It is concluded that fermentation differed between steers inoculums. The feed additives tested can be used to improve feed utilization, and to reduce GHG production for sustainable livestock production and improvement of environmental conditions. The best levels of feed additives were sunflower oil at 1 to 3%, *Schizochytrium* microalgae at 1 to 2%, and the mixture at 1 to 2%. The inclusion of *Schizochytrium* microalgae and the mixture of sunflower oil are not recommended in steer nutrition. The reduced diet's nutritive value with some levels, and increase with other levels, suggests it may be possible to prepare appropriate doses and mixtures of algae and sunflower oil to obtain both methane reduction, and maintain or improve feed utilization. These observations imply that the in vitro evaluation of feeds using different inoculums could be recommended to examine differences between animal species.

More research will be desirable to determine whether *Schizochytrium* microalgae and sunflower oil or their mixture could be used as feed additives for improving the environmental conditions, and affect feed utilization and methane production in dairy and beef cattle and steers.

Conflict of interest

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

Acknowledgements

Thanks to Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

References

Abubakr, A.R., Alimon, A.R., Yaakub, H., Abdullah, N., Ivan, M., 2013. Digestibility, rumen protozoa, and ruminal fermentation in goats receiving dietary palm oil by-products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(2), 147-154.

- Aderinboye, R.Y., Akinlolu, A.O., Adeleke, M.A., Najeem, G.O., Ojo, V.O.A., Isah, O.A., Babayemi, O.J., 2016. In vitro gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocula. *Slovak Journal of Animal Science*, 49(1), 32-43.
- Ammar, H., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ovejero, F.J., Gonzalez, J.S. Lopez, S. 2004. Effect of inoculums source (sheep or goat rumen fluid) on in vitro digestibility and gas production kinetics of the foliage of some Spanish browse plants. *Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneenes. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneenes, Montpellier, France*. 59, pp. 121–126.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* 48, 21-27.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Petit, H.V., 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Can. J. Anim. Sci.* 87(3), 431-440.
- Blümmel, M., Steingss, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77, 911–921.

- Boeckeaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., Fievez, V., 2007. In vitro examination of DHA-edible micro algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136(1), 63-79.
- Broderick, G.A., Kang, J.H., 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy Sci.* 63, 64-75.
- Bruinenberg, M.H., Van der Honing, Y., Agnew, R.E., Yan, T., Van Vuuren, A.M., Valk, H., 2002. Energy metabolism of dairy cows fed on grass. *Livest. Prod. Sci.* 75(2), 117-128.
- Bueno, I., Abdalla, A., Cabral Filho, S.L.S., Vitti, D., Owen, E., Mauricio, R., Givens, I., Sutton, J., Mould, F., 1999. Comparison of inocula from sheep and cattle for the in vitro gas production under tropical conditions. In: Annual Meeting of the British Society of Animal Science, 13, 151-156).
- Burnett, V.F., Jacobs, J.L., Norng, S., Ponnampalam, E.N., 2017. Feed intake, liveweight gain and carcass traits of lambs offered pelleted annual pasture hay supplemented with flaxseed (*Linum usitatissimum*) flakes or algae (*Schizochytrium sp.*). *Anim. Prod. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1071/AN15230>
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., Lamberet, G., 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86(5), 1751-1770.

- Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Bachmann, H., 2000. Influence of inoculums source, dilution and storage of rumen fluid on gas production profiles. In: Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation and to Assess Microbial Activity. Proceedings of the EAAP Satellite Symposium on Gas Production, Wageningen, The Netherlands. Proc. Br. Soc. Anim. Sci., 15–16.
- de Veth, M.J., Kolver, E.S., 2001. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. J. Dairy Sci. 84 (9), 2066–2072.
- Dehority, B.A., 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, NG11 OAX, UK. 372 pp.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M., 2001. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. Lett. Appl. Microbiol. 32(1), 47-51.
- Domingue, B.F., Dellow, D.W., Wilson, P.R., Barry, T.N., 1991. Comparative digestion in deer, goats, and sheep. New Zealand J. Agric. Res. 34(1), 45-53.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A., 2016. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. J. Clean. Prod. 135, 194–200.

- Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Cipriano, M.M., Camacho, L.M., Márquez, O., 2017. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* 45:1, 389-395
- Fievez, V., C. Boeckart, B. Vlaeminck, J. Mestdagh, and D. Demeyer. 2007. In vitro examination of DHA-edible micro-algae: 2. Effect on rumen methane production and apparent degradability of hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 80-95.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *J. Agr. Sci., Cambridge.*, 139, 341–352.
- Girard, V., Hawke, J.C., 1978. The role of holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. *Biochem. Biophys. Acta* 528, 17–27.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC.
- Hook, S.E., Wright, A.D.G., McBride, B.W., 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 2010. Article ID 945785, 11 pages; doi:10.1155/2010/945785.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483-2492.

- Jordan, E., Lovett, D.K., Hawkins, M., Callan, J.J., O'Mara, F.P., 2006. The effect of varying levels of coconut oil on intake, digestibility and methane output from continental cross beef heifers. *J Anim. Sci.* 82(06), 859-865.
- Kholif, A., Morsy, T., Matloup, O., Anele, U., Mohamed, A., El-Sayed, A.B., 2017b. Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *J. Agr. Sci.* DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859616000824>.
- Kholif, A.E., Morsy, T.A., Abd El Tawab, A.M., Anele, U.Y., Galyean, M.L., 2016. Effect of supplementing diets of Anglo-Nubian goats with soybean and flaxseed oils on lactational performance. *J. Agric. Food Chem.* 64, 6163-6170.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.
- Meale, S.J., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., Harstad, O.M., Chaves, A.V., 2012. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock. *Acta Agric. Scand. Section A–Anim. Sci.* 62, 199-211.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agr. Sci., Cambridge.*, 93, 217–222

- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Hannah, M.C., Eckard, R.J., Auldist, M.J., Ribaux, B.E., Jacobs, J.L., Wales, W.J., 2013. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 3177-3188.
- Morsy, T.A., Kholif, S.M., Kholif, A.E., Matloup, O.H., Salem, A.Z.M., Elella, A.A., 2015. Influence of sunflower whole seeds or oil on ruminal fermentation, milk production, composition, and fatty acid profile in lactating goats. *Asian Australas.J.Anim.Sci.* 28, 1116-1122.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. In vitro microbial inoculums: a review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 31-50.
- Narimani-Rad, M., Nahand, M.K., Shahryar, H.A., Maheri-Sis, N., Nobar, R.S., Lotfi, A., 2011. Influence of sunflower oil supplementation on in vitro gas production of mixed ration for ruminants. *Eur. J. Exp. Biol.* 1, 125-129
- Narimani-Rad, M., Shahryar, H.A., Nahand, M.K., Lotfi, A., 2012. Effect of sunflower oil supplementation on in vitro fermentation patterns of forage based diets for ruminant. *Bull. Env. Pharmacol. Life Scien.* 1, 73- 77
- Newbold, C.J., Chamberlain, D.G., 1988. Lipids as rumen defaunating agents. *Proc. Nutr. Soc.* 47, 154A.
- Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance,

and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim.Sci.* 84, 145-153.

SAS, 2002. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, NC.

Scholz, B., Liebezeit, G., 2012. Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. *Harmful Algae* 20, 58-70.

Sucu, E., Udum, D., Güneş, N., Canbolat, Ö., Filya, İ., 2017. Influence of supplementing diet with microalgae (*Schizochytrium limacinum*) on growth and metabolism of lambs during the summer. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* DOI: 10.3906/vet-1606-65

Ueda, K., A. Ferlay, J. Chabrot, J. J. Loor, Y. Chilliard, M. Doreau. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86, 3999-4007.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

Wanapat, M., Khampa, S., 2006. Effect of mineralized solid palm fat and feeding pattern on ruminal ecology and digestibility of nutrients in dairy steers fed on urea-treated rice straw. *Pakt. J. Nutr.* 5, 319–324.

Williams, A.G., Coleman, G.S., 2012. The rumen protozoa. Springer Science & Business Media.

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