



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

**"Influence of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal  
biomethane and carbon dioxide emissions in steers"**

**ARTICULO ESPECIALIZADO PARA PUBLICAR  
EN REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**PRESENTA**

**EDUARDO HERNÁNDEZ TÉLLEZ**

**ASESORES:**

DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR

DR. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM



TOLUCA, MÉXICO, JUNIO DE 2017.

## **DEDICATORIAS**

Dedico este artículo a mis padres y hermanos que hicieron posible mi sueño con todo el apoyo de manera moral, económica y psicológica, de una manera incondicional y que hoy en día lo logrado es el esfuerzo de todo un equipo.

Al Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem, por todo el apoyo incondicional durante la trayectoria académica.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, aun sin importar los obstáculos y que continuaron depositando su esperanza en mí.

Dedico este trabajo a todos aquellos que no creyeron en mí, a aquellos que esperaban mi fracaso en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios, a aquellos que nunca esperaban que lograra terminar la carrera, a todos aquellos que apostaban que me rindiera a medio camino, a todos los que supieron que no lo lograría.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de México, acompañada de la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia por la formación otorgada para crear en mí una persona autónoma y competente ante la sociedad.

Le agradezco a la Secretaría de Agricultura, ganadería, pesca y alimentación (SAGARPA) por haber aportado conocimientos a mi formación y darme la oportunidad de desarrollarme como persona.

Le agradezco al Rancho “El Redentor 19” por permitirme desarrollar mis conocimientos y adquirir nuevas experiencias para tener un mejor desarrollo.

## INDICE

<b>DEDICATORIAS</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>2.1 ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1.1 SACCHAROMYCES CEREVISAE .....	3
2.1.1.1 TAXONOMÍA .....	3
2.1.1.2 DESCRIPCIÓN MICOLÓGICA .....	3
<b>2.2 LEVADURA DE CERVEZA EN REEMPLAZO DEL NUCLEO     VITAMINICOMINERAL</b> .....	4
<b>2.3 LEVADURAS COMO ADITIVOS EN LA ALIMENTACION DE RUMIANTES</b> .....	5
<b>2.4 LEVADURAS</b> .....	5
<b>2.5 XILANASAS</b> .....	6
2.5.1 Características generales .....	6
<b>2.6 ¿PORQUÉ OCURRE EL CAMBIO CLIMÁTICO?</b> .....	7
<b>2.7 GANADERÍA BOVINA Y EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO</b> .....	7
<b>2.8 GASES PROVENIENTES DE LA GANADERÍA</b> .....	8
2.8.1 EMISIONES DE METANO POR FERMENTACIÓN ENTÉRICA .....	8
2.8.2 EMISIONES POR EL MANEJO DEL ESTIÉRCOL .....	9
2.8.3 EMISIONES DE ÓXIDO NITROSO DEBIDAS A LOS ANIMALES EN PASTOREO .....	10
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	12
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	14
5.1. D Objetivo general .....	14
5.2. E Objetivos específicos .....	14
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
6.1. Sustrato y tratamientos .....	15
6.2. Fermentación in vitro y biodegradación .....	15

6.3. Total de bacterias y protozoarios .....	17
6.4. Análisis químicos .....	18
6.5. Cálculos y análisis estadísticos .....	18
6.6. Análisis estadístico.....	19
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
7.1. Producción de gas .....	20
7.2. Población microbiana .....	20
7.3. Cinética de fermentación .....	20
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
8.1. Producción de gas .....	21
8.2. Gases de invernadero .....	22
8.3. Población microbiana .....	23
8.4. Cinética de fermentación .....	24
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO: ARTÍCULO .....</b>	<b>33</b>
<b>Influence of xylanase and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> on ruminal biomethane and carbon dioxide emissions in steers .....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la tierra se ha vuelto más cálida debido a la gran producción de gases de efecto invernadero. La producción ganadera es responsable de alrededor del 18% de las emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) y del 9% de la producción de dióxido de carbono (FAO, 2006).

El metano y el CO<sub>2</sub> son el resultado de la fermentación ruminal de los piensos, lo que provoca la pérdida de 2 a 12% de la energía dietética bruta (Hristov *et al.*, 2015). Los intentos, incluyendo la inclusión de *S. cerevisiae* (Elghandour *et al.*, 2017), sal de ácidos orgánicos (Elghandour *et al.*, 2016), enzimas exógenas (Kholif *et al.*, 2017) y aceites esenciales (Hernandez *et al.* 2017) se han utilizado para mitigar las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> ruminal de los piensos de rumiantes.

Basado en los balances energéticos reportados por Bruinenberg *et al.* (2002) y Nkrumah *et al.* (2006), la reducción de la emisión de CH<sub>4</sub> podría potencialmente aumentar la ganancia de peso corporal de ganado en crecimiento en 75 g / dy la producción de leche en vacas lecheras en aproximadamente 1 L / d.

Debido a que la Unión Europea ha prohibido la inclusión de antibióticos y ionóforos como aditivo en la alimentación animal, la exploración de aditivos alimentarios naturales alternativos para modificar la fermentación ruminal y mejorar la utilización de piensos (Salem *et al.*, 2014) y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, Elghandour *et al.*, 2017, Kholif *et al.*, 2017).

Los estudios han demostrado que la inclusión de enzimas exógenas en la alimentación de los rumiantes mejora el rendimiento productivo de los animales mejorando la digestibilidad de los nutrientes y la fermentación ruminal (Valdes *et al.*, 2015).

La inclusión de la levadura de *S. cerevisiae* ofrece un gran potencial para manipular la fermentación ruminal *in vitro* (Elghandour *et al.*, 2014) e *in vivo* (Ahmed *et al.*, 2015). La inclusión de *S. cerevisiae* en la dieta de los animales mejoró el valor nutricional de los

forrajes de mala calidad (Ahmed *et al.*, 2015), la digestibilidad de nutrientes (Hassan *et al.*, 2016) y las características de la carcasa animal (Velázquez-Garduño *et al.*, 2015).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ANTECEDENTES

#### 2.1.1 SACCHAROMYCES CEREVISAE

##### 2.1.1.1 TAXONOMÍA

Reino: *Fungi*

División: *Ascomycota*

Clase: *Hemiascomycetes*

Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Saccharomyces*

Especie: *S. cerevisiae*

##### 2.1.1.2 DESCRIPCIÓN MICOLÓGICA

Hongo levaduriforme que presenta células alargadas, globosas a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales (de 3-10 x 4,5-1 µm). Ascosporas esféricas o elipsoides y de pared lisa en su interior. Las colonias en agar glucosado de Sabouraud son cremosas, blandas y glabras como las formadas por *Candida*.

La levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) (Meyen E.C. Hansen) de *Saccharo* azúcar, *myces* hongo *ycerevisiae* cerveza) es un hongo unicelular, un tipo de levadura utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino. En su ciclo de vida alternan dos formas, una haploide y otra diploide. Ambas formas se reproducen de forma asexual por gemación. En condiciones muy determinadas la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente. En estos casos se produce la meiosis en la célula formándose un asca que contiene cuatro ascosporas haploides.

Cuando se adicionó 0,6 % de Levadura de cerveza a una ración iniciador, se obtuvieron diferencias significativas tanto en la Ganancia de Peso como en la Conversión Alimenticia (Miazzo, *et al.*, 1994).



## **2.2 LEVADURA DE CERVEZA EN REEMPLAZO DEL NUCLEO VITAMINICOMINERAL**

La sustitución de 0,05 y 0,1 % del núcleo vitamínico-mineral por 0,3 % de Levadura de cerveza comercial, tanto en dietas iniciadoras como terminadoras, aumentó la Ganancia de Peso y mejoró la Conversión Alimenticia de los pollos de carne, que habían este aditivo (Miazzo *et al.*, 2001). En otra investigación, el reemplazo de 2/3 del premix vitamínico mineral por 0,15 y 0,30 % de Levadura, en una dieta terminadora, mejoró las variables productivas, sobre todo en las aves que recibieron la dieta con mayor porcentaje de Levadura. (Miazzo *et al.*, 2003, 2005) Cuando se sustituyó la mitad del núcleo vitamínico mineral por 0,15 % y 0,30 % de *Saccharomyces cerevisiae*, en dietas de parrilleros terminador, las aves que recibieron mayores % de este aditivo tuvieron más Ganancia Media Diaria y fueron más eficientes que los otros dos grupos (Control y 0,15 % de Levadura) (Miazzo y Peralta, 2006).

Afirmando los resultados encontrados en estas experiencias, la adición de *Saccharomyces cerevisiae*, en la dieta de pollos de carne, no sólo sirvió como probiótico, sino que por la presencia algunos componentes del complejo B, pudo sustituir 1/3 del núcleo vitamínico mineral, obteniéndose buenos valores en la producción, y además es un producto de origen natural. Esto sería un aporte al descenso en el costo de producción de pollos de carne, mejorando tanto la productividad como la calidad de la canal.

En un intento por mejorar la utilización de este probiótico, en los últimos cinco años, las investigaciones a nivel mundial, se han orientado a verificar los efectos de cada uno de los componentes de *Saccharomyces cerevisiae*. Uno de los procesamientos más comunes incluye la realización de autólisis, y por acción de enzimas endógenas, se rompe la Pared celular y se libera el protoplasma, obteniéndose entonces Extracto (E) y Pared celular (PC) (Perdomo *et al.*, 2004).

La PC de la Levadura está compuesta principalmente de complejos de polímeros de  $\beta$ -glucanos,  $\alpha$ -mananos, manoproteínas y en menor cantidad quitina. Los mananos y manoproteínas representan el 30-40 % de la pared celular y determinan las propiedades de la superficie celular (Smits *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2005). Se ha investigado

ampliamente las funciones de estos componentes, y se llegó a la conclusión que los glucomananos fosforilados, tienen dos funciones básicas, ampliamente relacionadas: Influir en la ecología microbiana del intestino y actuar sobre el sistema inmune. En el intestino, actúan seleccionando la presencia de algunas bacterias y eliminando otras, que son nocivas para el ave. Por ejemplo, los patógenos con fimbrias tipo 1-específicas de manosa, como *Escherichia coli* y *Salmonella*, son atraídos por los mananos y se unen inmediatamente con el carbohidrato en vez de atacar las células epiteliales del intestino del ave (Spring *et al.*, 2000; Pérez-Sotelo *et al.*, 2005). En el sistema inmune, ayudan a proteger a los pollos de carne de los microorganismos (Celyk *et al.*, 2003; Khati *et al.*, 2007).

### **2.3 LEVADURAS COMO ADITIVOS EN LA ALIMENTACION DE RUMIANTES**

Tiempo atrás se inició con lo que actualmente se ha convertido en una interesante manera de trabajar con la situación alimentaria de los rumiantes, misma que ya no solo es con la formulación de dietas a base de forrajes y sus derivados, si no con la introducción de aditivos como son las levaduras que en los últimos años han pasado por procesos de evaluación para determinar si son económicamente rentables para aplicarlas y con ello incrementar considerablemente la productividad de los animales mediante una mejora en la actividad digestiva (Yang *et al.*, 2001).

Como lo afirmaron en su momento (Marrero *et al.* 2010), las levaduras han ido ganando terreno por los resultados satisfactorios que han mostrado ya que en el experimento que realizaron donde confirmaron que al incorporar una cepa de *S. cerevisiae* aumentaron las poblaciones de bacterias ruminales factibles para la producción de ácidos grasos volátiles.

### **2.4 LEVADURAS**

Este tipo de probióticos se clasifican como organismos eucariotes y a diferencia de las bacterias cuya medida oscila entre (0.5 x 5 µm), son resistentes a antibióticos, además de tener un mayor tamaño alrededor de 5 x 10 µm (Auclair., 2001).

Las levaduras tienen una amplia capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal mediante mecanismos de entre los que destacan el farmacocinético permitido por ser

resistentes a la acidez gástrica y proteólisis y el farmacodinámico con el antagonismo directo que sugiere que previene que el intestino se inflame con la presencia de agentes patógenos (Mansour, F. 2003).

Se puede considerar que las más utilizadas son las de *Saccharomyces*, observando repuestas más favorables en ganado lechero aumentando la capacidad de degradación de la fibra y la producción (Newbold, 2003).

Sus efectos benéficos radican en la regulación del pH, aportan vitaminas a las bacterias ruminales haciéndolas más viables.

Cuando la dieta está constituida por una proporción elevada de concentrado es cuando más se recomienda el uso de levaduras, por ejemplo, al comienzo de la lactación (Van Vuuren; 2003).

## **2.5 XILANASAS**

### **2.5.1 Características generales**

Las endoxilanasas o xilanasas son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos B (1-4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilo- oligosacáridos de diferentes tamaños (Biely, 1985).

La mayoría de las enzimas que forman parte de los celulosomas son celulasas, pero también se encuentran xilanasas (Pason *et al*, 2006).

El xilano es el principal carbohidrato encontrado en la fracción hemicelulósica de los tejidos vegetales y constituye la tercera parte de todo el carbón orgánico renovable sobre la tierra.

La xilanasas (E.C.3.2.1.8;  $\beta$  1,4 xilano xilano hidrolasa), componente mayoritario de un complejo sistema enzimático, actúa en la naturaleza depolimerizando las moléculas de xilano en unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por bacterias y hongos como fuente principal de carbono.

Las xilanasas unidas a las glicósido-hidrolasas (responsables de la ruptura enzimática de la celulosa de la planta) cointeractúan en la acumulación ilimitada de biomasa vegetal, son un elemento fundamental de interés biotecnológico y juegan en su conjunto un papel central durante la hidrólisis de la pared celular de la planta.

La adición de xilanasas permite la reducción de energía (105 kilocalorías) y PC (2%) en dietas a base de sorgo para cerdos en iniciación manteniendo la respuesta productiva y las características de la canal, en comparación con dietas con una concentración estándar de EM y PC.

## **2.6 ¿PORQUÉ OCURRE EL CAMBIO CLIMÁTICO?**

La atmósfera terrestre está compuesta principalmente por nitrógeno y oxígeno y contiene pequeñas cantidades de hidrógeno, helio, argón, neón y otros gases. Algunos de estos últimos, tales como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el metano ( $\text{CH}_4$ ), son los principales gases de efecto invernadero. Un gas de efecto invernadero es aquel que atrapa la radiación infrarroja (calor) en la atmósfera, lo cual deriva en el calentamiento del planeta; este fenómeno natural es muy beneficioso, ya que sin él la Tierra tendría una temperatura de aproximadamente 60°F menos y sería incapaz de mantener las formas de vida vegetal y animal tales como las conocemos. Durante el siglo pasado, las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera se han elevado acentuadamente. Esto se debe, en gran medida, al incremento en la producción de los mismos a partir de las actividades humanas o fuentes antropogénicas, tales como la quema de combustibles fósiles.

## **2.7 GANADERÍA BOVINA Y EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO**

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la actividad ganadera genera aproximadamente 7.1 giga toneladas de dióxido de carbono al año, 14.5% de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) inducidas por la actividad humana. La producción de carne y leche de bovino aportan 64.8% de las emisiones de GEI del sector (FAO, 2014).

Las principales fuentes de emisión de GEI del sector son la fermentación entérica o producción de metano por el proceso digestivo de los rumiantes, aproximadamente 46% de las emisiones provienen de la producción de leche y 43% de la producción de carne de bovino.

En segundo lugar se ubica el manejo, fertilización y producción de forrajes con 36% del total de la emisión de GEI, principalmente con emisiones de óxido nitroso.

Entre los sistemas de producción bovina destacan las emisiones del segmento de menor productividad, dado el uso de alimentos de bajo aporte nutricional o difíciles de digerir. Es decir, con mayor fermentación entérica y producción de estiércol, así como bajo desarrollo de peso por año y mayor edad de sacrificio en los animales, lo que es mayor periodo de vida y producción de GEI por unidad animal.

De acuerdo a los datos de la FAO, en el 2012 México tenía 5.5 % del hato lechero de América Latina y el Caribe, así como 7.9 % del ganado para la producción de carne, por lo que es un importante emisor de GEI en la región.

## **2.8 GASES PROVENIENTES DE LA GANADERÍA**

### **2.8.1 EMISIONES DE METANO POR FERMENTACIÓN ENTÉRICA.**

La producción de metano es parte de los procesos digestivos normales de los animales, durante la digestión, los microorganismos presentes en el aparato digestivo fermentan el alimento consumido por el animal. Este proceso conocido como fermentación entérica, produce metano como un subproducto, que puede ser exhalado o eructado por el animal. Entre las especies ganaderas, los rumiantes (bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, camélidos) son los principales emisores de metano.

En condiciones normales, los rumiantes son alimentados con forrajes, compuestos por celulosa. El proceso de fermentación, que tiene lugar en el rumen, ofrece una oportunidad para que los microorganismos desdoblén la celulosa, transformándola en productos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal.

Estos organismos forman una ecología compleja, que incluye mecanismos de competición y simbiosis, su población es fuertemente influenciada por la composición de la dieta consumida por el animal. Las bacterias metanogénicas son las responsables de la producción del metano y, si bien constituyen una fracción muy pequeña de la población microbiana total, cumplen una función muy importante, al proveer un mecanismo para eliminar el hidrógeno producido en el rumen.

En los animales no rumiantes (porcinos, equinos, mulares, asnales) la fermentación microbiana ocurre en el intestino grueso, que tiene una capacidad de producción de metano mucho menor que el rumen. Debido a que esta producción es el resultado de procesos digestivos, la cantidad emitida varía con el tipo de animal, con la naturaleza, cantidad y digestibilidad del alimento consumido y con el nivel de producción.

### **2.8.2 EMISIONES POR EL MANEJO DEL ESTIÉRCOL.**

El manejo del estiércol del ganado produce emisiones de metano y de óxido nitroso. El metano se produce mediante la descomposición anaeróbica del estiércol, mientras que el óxido nitroso se forma como parte del ciclo del nitrógeno, a través de la de nitrificación del nitrógeno orgánico presente en el estiércol y en la orina del ganado.

Cuando el estiércol se dispone en sistemas que promueven las condiciones anaeróbicas (por ejemplo, en forma líquida en lagunas, tanques o fosas), la descomposición de la materia tiende a producir metano. Cuando el estiércol se maneja en forma sólida (por ejemplo, almacenamiento en pilas) o queda depositado sobre las pasturas y los campos naturales, tiende a descomponerse aeróbicamente y produce muy poco o nada de metano; la temperatura y la humedad influyen en el desarrollo de las bacterias responsables de su formación.

La composición del estiércol, que depende de la dieta de los animales, también afecta la cantidad de metano producido, cuanto mayor es el contenido energético y la digestibilidad del alimento, mayor es el potencial de emisión de metano. Por ejemplo, los animales en feedlot, alimentados con dietas altamente energéticas, generan estiércol con gran capacidad de producción de metano, mientras que el ganado mantenido con forrajes

de baja concentración energética, producen estiércol con la mitad de capacidad de formación de metano que en el caso del feedlot.

La cantidad de óxido nitroso producido es variable, dependiendo de la composición del estiércol y la orina, del tipo de bacterias involucradas en el proceso y de la cantidad de oxígeno y líquido en el sistema de manejo. Las emisiones de óxido nitroso resultan del estiércol y la orina del ganado que se maneja en sistemas líquidos o que se recolecta y almacena en forma sólida.

En 1997, las emisiones de metano fueron de 98,678 Tn., 4,7 % inferiores a las de 1990 y 17,3 % inferiores a las de 1994. Los porcinos, a pesar de su relativamente escaso número, son los principales responsables de estas emisiones, debido a que son la especie ganadera que se mantiene con mayor grado de confinamiento en el país, manejándose sus efluentes en forma líquida.

### **2.8.3 EMISIONES DE ÓXIDO NITROSO DEBIDAS A LOS ANIMALES EN PASTOREO.**

El óxido nitroso se produce naturalmente en los suelos, varias actividades agropecuarias agregan nitrógeno a los suelos, incrementando así la cantidad de este elemento que está disponible para la nitrificación y denitrificación y, por lo tanto, la cantidad de óxido nitroso emitido. Estas actividades pueden sumar nitrógeno a los suelos tanto en forma directa como indirecta. La deposición de estiércol y orina de los animales que se mantienen en pastoreo, sobre los campos naturales y las pasturas, es una de las vías directas de incorporación de nitrógeno a los suelos. Las adiciones indirectas ocurren por dos mecanismos:

- 1) la volatilización y subsiguiente deposición atmosférica del nitrógeno excretado, en forma de amoníaco y óxidos de nitrógeno y
- 2) la lixiviación y el escurrimiento del nitrógeno excretado.

♦ Emisiones directas: Estas emisiones corresponden al óxido nitroso que se produce a partir del estiércol y la orina de los animales, que no se utilizan como fertilizantes ni se tratan de ninguna manera, sino que quedan depositados sobre las pasturas o campos

naturales. En la República Argentina, el 96 % del nitrógeno excretado por el ganado tiene este destino. Las emisiones de óxido nitroso directas del suelo, debidas a la producción animal, fueron de 80,45 Gg, para el año 1997, resultando algo inferiores a las de los años 1990 y 1994 y reflejando la disminución de las existencias ganaderas.

- ◆ Emisiones indirectas: Estas emisiones corresponden al óxido nitroso que se produce indirectamente a partir del nitrógeno excretado por los animales. Mediante la volatilización, parte de este nitrógeno entra a la atmósfera en forma de amoníaco y óxidos de nitrógeno, y luego retorna a los suelos por deposición atmosférica, aumentando así la producción de óxido nitroso. Otra parte se pierde de los suelos a través del escurrimiento superficial y la lixiviación, uniéndose a los sistemas de aguas subterráneas y superficiales, a partir de los cuales se emite una proporción de óxido nitroso. Las emisiones de óxido nitroso indirectas del suelo, para el año 1997, fueron de 39,95 Gg.



### **3. JUSTIFICACIÓN**

La emisión de gases de efecto invernadero ha ocasionado el calentamiento global y directamente afectado la salud pública y animal, en donde ciertas investigaciones realizadas a través del tiempo han mostrado ciertos factores desencadenantes; entre ellos la ganadería, en donde algunas especies cuentan con compartimientos gástricos y uno de ellos teniendo la función fermentativa, originando gases como el CO<sub>2</sub> Y CH<sub>4</sub>. Es ahí en donde entra el principal papel de M.V.Z para encontrar alternativas de alimentación, que no repercutan directamente en la emisión de gases efecto invernadero y que tenga la capacidad de mejorar el trabajo digestivo del rumiante para un mayor aprovechamiento nutricional que cubra los requerimientos para mantener una ganadería productiva y rentable.

#### **4. HIPÓTESIS**

La utilización de diferentes aditivos como la xinalasa y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en bovinos ocasiona algunos cambios en la microbiota ruminal, resultando en un mejor valor nutricional de la dieta y una disminución de la producción de GEI.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. D Objetivo general**

Determinar el efecto de *S. cerevisiae*, xilanasa y su mezcla como aditivos amigables del ambiente en la mitigación sostenible de las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, la población ruminal microbiana y la fermentación ruminal de una ración altamente concentrada usando inóculo ruminal de bovinos.

### **5.2. E Objetivos específicos**

Observar el comportamiento en la disipación de gases efecto invernadero durante la interacción inóculo- aditivo.

Observar el mejoramiento nutricional en bovinos con la utilización de aditivos como la xinalasa y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Sustrato y tratamientos**

Se preparó una ración mixta total (TMR) como sustrato y contenía (por kg de MS): 520 g de grano de sorgo molido, 300 g de harina de maíz, 60 g de harina de soja, 80 g de melaza y 40 g de urea. La composición química del TMR fue de 963 g de materia orgánica (OM), 183 g de proteína bruta (CP), 304 g de fibra detergente neutro (FDN) y 261 g de fibra detergente ácida (ADF). El TMR sin aditivo se consideró como un tratamiento de control. La TMR basal se suplementó (por g de sustrato de DM) con xilanas a 2 ml, *S. cerevisiae* a 4 mg, o su mezcla a 2 ml de xilanas + 4 mg de *S. cerevisiae* por g de sustrato de DM.

### **6.2. Fermentación in vitro y biodegradación**

Se recolectó inóculo ruminal de dos bovinos Holstein canulados en rumen ( $450 \pm 20$  kg de peso corporal), y alimentados con una dieta consistente en heno de avena y concentrado (PURINA®, Toluca, México) a razón de 60:40 ad libitum, con libre acceso al agua. Los animales se alimentaron dos veces al día a las 08:00 y 16:00 h, y se manejaron según 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).

Los contenidos de rumen se colocaron en un termo plástico precalentado a  $39^\circ\text{C}$  y se transportaron al laboratorio donde se lavó con  $\text{CO}_2$ , se mezclaron y se sometieron a un vaciado a través de cuatro capas de estopilla en un espacio libre de oxígeno. El contenido de rumen se mantuvo a una temperatura constante de  $39^\circ\text{C}$  con un flujo continuo de  $\text{CO}_2$ . Antes del proceso de incubación, el medio de incubación que contenía disoluciones tampón, macro mineral, micro mineral 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 ajustado a  $39^\circ\text{C}$  para mantener la temperatura y homogeneizar la solución. En consecuencia, el inóculo ruminal y la solución reductora se mezclaron en la proporción de 1: 4 vol / vol, respectivamente. Se pesaron muestras (0,5 g) del sustrato en botellas de suero de 120 ml con adición apropiada de los aditivos (es decir, xilanas o *S. cerevisiae* o su mezcla). En consecuencia, se añadieron 50 ml de licor de rumen previamente preparado y el tampón. Las botellas se mantuvieron a un flujo

constante de CO<sub>2</sub> durante 30 segundos y después se taparon con tapones de neopreno y después se sellaron con anillos de aluminio. Los viales se colocaron en una incubadora (Riossa®, F-51 D, Estado de México, México) a 39 ° C durante 48 h. Además, se incubaron tres botellas como blancos (sólo fluido ruminal) durante 48 h. Se realizaron tres pruebas de incubación en tres semanas.

Las lecturas de producción de gas se realizaron a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 h de incubación usando un aparato de desplazamiento de agua según Fedorak y Hruday (1983). El aparato fue diseñado 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. La producción de gas (mL) se midió por el desplazamiento de agua en la bureta.

Después de 48 h de incubación, se tomaron 5 ml de gas y se almacenaron en los viales con solución salina saturada preparada con 400 g de NaCl en 1 l de agua destilada y se ajustó el pH en consecuencia. Se añadieron dos y 5 ml de naranja de metilo al 20% como indicador para la determinación de las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. La solución salina saturada preparada previamente se almacenó en viales serológicos de 60 ml sin espacio de cabeza; Y los tapones de neopreno fueron colocados y sellados con anillos de aluminio, y almacenados lejos de la luz. Para la determinación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, se tomó una muestra de 10 µl de la fase gaseosa de los viales con solución salina saturada y se inyectó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer, Claurus 500 (Ciudad de México, México) con detección de ionización de llama y helio como gas portador. Se utilizó un detector de conductividad térmica con las temperaturas de horno, columna y TCD fijadas a 80°C, 170°C y 130°C, respectivamente. Los tiempos de retención fueron 0,73 min y 1,05 min para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Al final de la incubación a las 48 h, el proceso de fermentación se detuvo por remolino de las botellas en hielo durante 5 minutos, a continuación, las botellas fueron sin tapar y el pH se midió inmediatamente usando un medidor de pH (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, USA).

El contenido de las botellas se filtró en bolsas Ankom® Technologies F57 (a peso constante), con la ayuda de un sistema de filtración conectado a una bomba de vacío. Las botellas se enjuagaron con agua caliente tres veces para asegurar la recuperación de todo el residuo de fermentación. Las bolsas se secaron a continuación en un horno de aire forzado ajustado a 55°C durante 48 h. La degradación de la materia seca se calculó por diferencia entre el peso inicial del sustrato seco y el peso del residuo seco. Después de la medición del pH y filtración, se obtuvieron 4 ml del medio con una jeringa y se mezclaron con 1 ml de ácido metafosfórico al 25%, se agitaron ligeramente y se colocaron en un congelador hasta el análisis de la concentración de amoníaco-N. Se mezclaron otros 4 ml del medio con 1 ml de formaldehído al 10% y se agitaron ligeramente, luego se colocaron en un refrigerador a 4°C hasta el análisis del recuento bacteriano y protozoario.

### **6.3. Total de bacterias y protozoarios**

La concentración de bacterias totales se determinó después de 48 h de incubación usando una bacteria de cámara de conteo Petroff-Hausser (Hausser Scientific®, 3900, Horsham, PA) y un microscopio de contraste de fase (Olympus®, BX51, Ciudad de México, México) De 100 x. Se tomaron exactamente 0,5 ml de la muestra de medio fijado al 10% de formaldehído y se diluyó en 4,5 ml de agua destilada. La concentración de bacterias por ml se determinó como el promedio de bacterias observadas en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de dilución y el factor de cámara ( $2 \times 10^7$ ), de acuerdo con la siguiente fórmula:  $\text{Número bacteriano / mL} = \mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2^7$  Donde:  $\mu$  es el promedio de bacterias en cada cuadrícula por tratamiento, FD1 es el primer factor de dilución (1,25) y FD2 es el segundo factor de dilución (10). Para el recuento de protozoos, se obtuvo 1 ml de la muestra fija de formaldehído al 10% y se diluyó en 1 ml de agua destilada, luego se tomaron 0,5 ml de la mezcla con una pipeta Pasteur (BRAND, 7712, Wertheim, Alemania) y se depositó en una Neubauer (BRAND, 7178-10, Wertheim, Alemania), posteriormente observado en un microscopio de contraste (Carl Zeiss®, Axiostar, Ciudad de México, México) con un aumento de 400x. El recuento de protozoos se realizó en ocho cuadrantes (4 de cada cuadrícula), tomando como protozoos viables los que mantuvieron su integridad morfológica. La concentración de protozoos por ml de medio de cultivo se estimó como el promedio de protozoos observados en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de dilución y el factor de cámara

(1 × 10<sup>4</sup>), según la fórmula: Número de protozoos =  $\mu \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times [10]^{-4}$  Donde: =  $\mu$  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).

#### 6.4. Análisis químicos

Se analizaron muestras de TMR para DM (# 934.01), ceniza (# 942.05), N (# 954.01) y extracto de éter (EE; # 920.39) según AOAC (1997). Se analizaron las TMR en cuanto al contenido de FDN (Van Soest *et al.*, 1991), ADF y lignina (AOAC, 1997; # 973.18) usando una Unidad de Analizador de Fibra ANKOM200 (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, EE.UU.) con el uso de Una alfa-amilasa y sulfito sódico. La concentración de N amoniaco ruminal se determinó según el método de Broderick y Kang (1980). La muestra del medio de incubación se centrifugó a 3000 xg durante 10 min y se mezclaron 20  $\mu$ l del sobrenadante con 1 ml de fenol y 1 ml de hipoclorito y la mezcla se incubó a 39 ° C durante 30 minutos y después se diluyó con 5 ml De agua destilada. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible (Varian, modelo Cary 1E, California, EE.UU.) a 630 nm. La concentración mg / dL resultante se dividió por el factor 0,8, que es el factor de dilución de ácido metafosfórico al 25%.

#### 6.5. Cálculos y análisis estadísticos

Para la estimación de GP cinética, 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)  $y = b \times [1 - e^{-c(t - L)}]$  Donde y es el volumen de GP en el tiempo t (h); B es la GP asintótica (ml / g de DM); C es la velocidad fraccionaria de fermentación (/ h), y L (h) es el tiempo de retardo discreto antes de que se libere cualquier gas. La energía metabolizable (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)  $\text{ME} = 2,20 + 0,136 \text{ GP (ml / 0,5 g DM)} + 0,057 \text{ CP (g / kg de DM)}$  (3)  $\text{OMD} = 148,8 + 8,89 \text{ GP} + 4,5 \text{ CP (g / kg DM)} + 0,651 \text{ cenizas (g / kg DM)}$  Donde GP es neto GP en ml de 200 mg de muestra seca después de 24 h de incubación. Se calculó el factor de reparto a las 24 h de incubación (PF24, una medida de la eficacia de fermentación) como la relación de la degradabilidad de la MS in vitro (mg) al volumen (ml) de GP a las 24 h (es decir,  $\text{DMD} / \text{GP total GP24}$ ) Según Blümmel *et al.* (1997). El rendimiento de gas (GY24) se calculó como el volumen

de gas (ml de gas / g de MS) producido después de 24 h de incubación dividido por la cantidad de DMD (g) como: (4)  $GY_{24} = \text{ml de gas} / \text{g de DM} / \text{g de DMD}$

Las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) se calcularon de acuerdo con Getachew *et al.* (2002) como: (5)  $SCFA (\text{mmol} / 200 \text{ mg DM}) = 0,0222 GP - 0,00425$   
Donde GP es el GP neto de 24 h (mL / 200 mg de DM).

Se calculó la producción de biomasa microbiana (MCP) (Blümmel *et al.*, 1997) como: (6)  $MCP (\text{mg} / \text{g de DM}) = \text{Milligramas DMD} - (\text{Gas mililitro} \times 2,2 \text{ mg} / \text{ml})$   
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 (Blümmel *et al.*, 1997).

## 6.6. Análisis estadístico

Los datos de cada una de las tres series dentro de la misma muestra de cada una de las tres muestras individuales de raciones se promediaron antes del análisis estadístico y los valores medios para cada muestra individual utilizada como unidad experimental. El diseño experimental fue un diseño factorial con 3 repeticiones en un diseño de bloques completos al azar. Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM (SAS, 2002) utilizando el modelo:  $Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + (R \times A)_{ij} + \epsilon_{ijk}$  donde:  $Y_{ijk}$  es la observación,  $\mu$  es la media de la población,  $R_i$  es la fuente del inóculo,  $A_j$  es el tipo de aditivos alimentarios,  $(R \times A)_{ij}$  es la interacción entre el tipo de aditivo alimentario y la fuente del inóculo, y  $\epsilon_{ijk}$  es el error residual. La prueba de Tukey se utilizó para comparar medios.



## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Producción de gas**

No se observaron interacciones tipo inóculo x tipo de aditivo para todos los parámetros de las producciones de GP, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Tabla 1). El tipo de aditivo alimentario afectó ( $P < 0,05$ ) la producción de GP y CH<sub>4</sub>. La Figura 1 muestra GP a diferentes horas de incubación y el efecto del inóculo y aditivos para piensos. Los aditivos disminuyeron ( $P = 0,029$ ) el tiempo de retraso del GP con el inóculo de bovino. Los aditivos no tuvieron ningún efecto sobre la producción de CH<sub>4</sub> (ml / g de DM). Sin embargo, los aditivos disminuyeron el ingesto proporcional de CH<sub>4</sub> ( $P = 0,041$ ). La inclusión de *S. cerevisiae* y xilanasa resultó en una producción de CO<sub>2</sub> más alta ( $P < 0,05$ ) (mL / g de MS) y producción proporcional de CO<sub>2</sub> a las 48 h de incubación.

### **7.2. Población microbiana**

Se observó una interacción entre la fuente del inóculo y el tipo de aditivo ( $P < 0,001$ ) para el recuento total de protozoos pero no hubo interacción ( $P > 0,05$ ) para el recuento bacteriano total (Tabla 2). El tipo de aditivo no afectó ( $P > 0,05$ ) ambos de los recuentos totales de bacterias y protozoos. Para todas las fuentes de inóculo, Los contajes bacterianos fueron mayores ( $P < 0,05$ ), mientras que los recuentos protozoarios totales no fueron afectados ( $P > 0,05$ ) por la adición de *S. cerevisiae*, xilanasa o su mezcla.

### **7.3. Cinética de fermentación**

No se observaron interacciones ( $P > 0,05$ ) y el tipo de aditivo para todos los parámetros medidos de la cinética de fermentación (Tabla 2). No se observó efecto ( $P > 0,05$ ) con la adición de *S. cerevisiae* o xilanasa a pH ruminal, concentración de NH<sub>3</sub>-N, PF24 y GY24. Los aditivos resultaron en una mayor DMD con bovinos ( $P = 0,037$ ) inóculos.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Producción de gas

La ausencia de la fuente de inóculo y la interacción del tipo de aditivo alimentario revelan que los efectos del aditivo no dependen del inóculo. Aderinboye *et al.* (2016) observaron diferentes parámetros de fermentación entre vacas, ovinos y caprinos por diferentes poblaciones bacterianas y protozoarias y actividad microbiana entre cabras, ovejas y novillos (Aderinboye *et al.*, 2016). Debido a que la población microbiana ruminal depende principalmente del tipo de dieta alimentada y dado que todas las cabras, ovejas y novillos se mantuvieron en la misma dieta, no se esperaba que las especies microbianas variaran (Mold *et al.*, 2005). Además, Mold *et al.* (2005) informaron que otros factores incluyendo los efectos del animal huésped, la preparación de la muestra y la inoculación podrían causar algunas variaciones en las especies microbianas. Ammar *et al.* (2004) también informaron otros factores que podrían causar algunas variaciones entre los inóculos de diferentes especies animales e influir en la microflora intestinal, incluyendo el comportamiento de masticar / comer, la fisiología del intestino, las dimensiones del compartimiento y el tiempo de retención.

La producción de gas difirió entre los aditivos alimentarios probados. Esto se esperaba porque cada uno de los aditivos tiene un modo de acción diferente para afectar la fermentación ruminal (Hernandez *et al.*, 2017). Sin embargo, muchos informes observaron que la inclusión de *S. cerevisiae* (Elghandour *et al.*, 2014) y enzimas (Vallejo *et al.*, 2016) dio como resultado GP mayor. La *S. cerevisiae* y la xilanasa tuvieron un débil efecto sobre la GP con inóculo bovino. De acuerdo con los resultados actuales, Hernandez *et al.* (2017) observaron efectos insignificantes con la xilanasa exógena y *S. cerevisiae* en la cinética GP. Los aditivos mayor tasa de GP y disminuyó el tiempo de retraso de GP que revela una mejor utilización de nutrientes. Estudios recientes han demostrado que la inclusión de enzimas exógenas en las dietas de los rumiantes mejora la utilización de piensos, la digestión de la MS y el rendimiento animal mejorando la degradación de la MS (Morsy *et al.*, 2016). Rodriguez *et al.* (2015) observaron que la adición de *S. cerevisiae* disminuyó la tasa de GP. Esta inconsistencia puede deberse a la composición de los sustratos (Elghandour *et al.*, 2014). El menor tiempo de retraso de GP puede deberse a una mayor degradación de los nutrientes de la alimentación, especialmente las fibras

(Kholif *et al.*, 2016, Elghandour *et al.*, 2017). Las enzimas exógenas tienen la capacidad de estimular las fases iniciales de colonización microbiana en el rumen y facilitar la fijación bacteriana a las partículas de alimentación (Giraldo *et al.*, 2007). Se informó que *S. cerevisiae* consumía de manera efectiva moléculas de O<sub>2</sub> desde el rumen, haciendo que el ambiente ruminal fuera más proporcional para la actividad óptima de varios microorganismos (Newbold *et al.*, 1996). Además, Callaway y Martin (1997) informaron que *S. cerevisiae* contiene péptidos pequeños y muchos nutrientes importantes requeridos para el crecimiento y la actividad de los microorganismos ruminales, especialmente las bacterias celulolíticas ruminales para iniciar el proceso de fermentación (Paya *et al.*, 2007). Williams *et al.* (1991) informaron un efecto de estimulación de *S. cerevisiae* sobre la degradación de la celulosa, que se asoció con un menor tiempo de retraso y mayores tasas iniciales de digestión, sin afectar el grado de digestión ruminal. La disminución del tiempo de retraso de GP con xilanasas y *S. cerevisiae* revela la capacidad de estos aditivos para superar el problema de las bajas ingestas y la digestión lenta de forrajes de baja calidad (Salem *et al.*, 2015).

## **8.2. Gases de invernadero**

La producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> puede diferir y puede deberse a la diferente población de microflora ruminal. Hook *et al.* (2010) observaron diferentes producciones de CH<sub>4</sub> de diferentes especies de rumiantes. Boeckeaert *et al.* (2007) informaron que la población protozoaria ruminal varió de animal a animal, a pesar de la alimentación de las mismas dietas. La diferente producción de CH<sub>4</sub> entre especies ruminales indica que una especie no pudo utilizarse para predecir la producción de CH<sub>4</sub> (Bueno *et al.*, 2005) para otra especie. Como se ha demostrado anteriormente, la emisión de CH<sub>4</sub> entérica contribuye a una pérdida de energía neta de alimentación (Hristov *et al.*, 2015). Por lo tanto, esfuerzos de investigación intensivos se han dirigido recientemente hacia la mitigación de la producción de CH<sub>4</sub> de rumiantes (Elghandour *et al.*, 2016b). Durante el proceso de fermentación ruminal dentro del rumen, se producen gases que consisten principalmente en CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Por lo tanto, el GP no afectado y la producción proporcional de CH<sub>4</sub> más baja revelan que los aditivos fueron eficaces para reducir la producción de CH<sub>4</sub>, y pueden servir como métodos eficaces para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> de los rumiantes. Polyorach *et al.* (2014) observaron que la suplementación con *S. cerevisiae* disminuyó la

producción in vitro de CH<sub>4</sub>, lo que apoya los hallazgos actuales. Además, Salem *et al.* (2015) y Kholif *et al.* (2016) también observaron que la adición de enzimas disminuyó la producción de CH<sub>4</sub> en dietas equinas. En la nutrición de los rumiantes, no se esperaba que la xilanasa redujera la producción de CH<sub>4</sub> porque se ha demostrado que la xilanasa aumenta la disponibilidad de hemicelulosa y, por tanto, la producción de CH<sub>4</sub> (Elghandour *et al.*, 2016b). Sin embargo, las razones de esto no están claras. La producción de CH<sub>4</sub> disminuida puede explicarse basándose en la capacidad de la xilanasa para estimular los acetógenos reductores en el rumen que altera el metabolismo H<sub>2</sub> y su utilización por metanógenos para reducir la formación de CH<sub>4</sub> y las emisiones (Stewart *et al.*, 1997).

*S. cerevisiae* redujo la producción de CH<sub>4</sub> debido a la capacidad de *S. cerevisiae* para estimular los acetógenos a través de su competencia y co-metabolización de H<sub>2</sub> con metanógenos (Hristov *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que la inclusión de *S. cerevisiae* en las dietas de los rumiantes mejora la digestibilidad de los nutrientes (Hassan *et al.*, 2016) y altera la producción de SCFA en el rumen elevando las poblaciones de bacterias celulolíticas y amilolíticas en el rumen (Kumar *et al.*, 1997). El modo de acción completo para la reducción de la producción de CH<sub>4</sub> no está claro, ya que algunos estudios informaron aumento de la producción de CH<sub>4</sub> con suplementación con *S. cerevisiae* (Elghandour *et al.*, 2017). Newbold y Rode (2006) informaron una disminución de la producción de CH<sub>4</sub> con la alimentación de *S. cerevisiae* productos vivos.

La discusión anterior sugiere que tanto *S. cerevisiae* como xylanasa actúan sobre la metabolización de H<sub>2</sub> en el rumen porque se produce una cantidad copiosa de H<sub>2</sub> y junto con CO<sub>2</sub> de la degradación ruminal de materia orgánica se utilizan para sintetizar CH<sub>4</sub> por *Archaea* metanogénica Hernandez *et al.*, 2017).

### **8.3. Población microbiana**

Los aditivos no afectaron el recuento total de protozoos. Corona *et al.* (1999) y Chung *et al.* (2012) informaron que la población de protozoarios no fueron afectados por *S. cerevisiae* y la administración de suplementos de enzimas fibrolíticas en carneros y vacas. *S. cerevisiae* y xilanasa resultaron en números bacterianos totales más altos. Newbold *et al.* (1996) observaron que la suplementación con *S. cerevisiae* aumentó el recuento total de bacterias anaerobias y celulolíticas. El mayor número de bacterias con *S. cerevisiae* es

el resultado de proporcionar al medio de incubación, importantes nutrientes cofactores nutricionales y vitaminas como la biotina y la tiamina, que son necesarios para mejorar el crecimiento microbiano y la actividad. (Callaway y Martin, 1997). Además, *S. cerevisiae* proporciona condiciones anaeróbicas propicias al crecimiento microbiano (Mosoni *et al.*, 2007), haciendo que el ambiente ruminal sea más adecuado para el crecimiento microbiano. Por otra parte, la enzima exógena, como la xilanasa, puede estimular las bacterias ruminales fibrolíticas y no fibrolíticas mediante la liberación de carbohidratos que son fácilmente utilizados por las bacterias (Nsereko *et al.*, 2002). Un mayor número de bacterias con la inclusión de celulasa y xilanasa en el medio de incubación *in vitro* fue observado por Mao *et al.* (2013).

#### **8.4. Cinética de fermentación**

Mao *et al.* (2013) informaron que la inclusión de *S. cerevisiae* en la dieta de los rumiantes aumentó la producción total de SCFA y ácido propiónico. La mayor producción de SCFA y las concentraciones de ME están asociadas con actividades mejoradas de la microflora ruminal. Como se ha demostrado anteriormente, el número de bacterias ruminal más altas con los aditivos es la razón para una fermentación ruminal mejorada. Al mismo tiempo, la DMD mejorada con el inóculo bovino.

Colonización de las paredes celulares de las plantas resultando en DM mejorada y digestión de las fibras (Patra, 2012). La mayor degradabilidad está relacionada con la capacidad de la xilanasa para potenciar la unión y colonización de los microbios rumánicos para plantar partículas de la pared celular (Nsereko *et al.*, 2002). Además, la inclusión de una enzima exógena aumenta la interacción sinérgica entre las enzimas ruminales endógenas y la enzima exógena que da como resultado una degradabilidad mejorada de los nutrientes. La degradabilidad mejorada con la inclusión de *S. cerevisiae* puede ser el resultado de un ambiente ruminal mejorado con suplementación con *S. cerevisiae* (Newbold *et al.*, 1996; Callaway y Martin, 1997). Hernández *et al.* (2017) informaron que la inclusión de *S. cerevisiae* y xylanase no afectó a la DMD, pero disminuyó la cinética de fermentación.

## 9. CONCLUSIÓN

*S. cerevisiae* y la enzima fibrolítica xilanasa no afectaron la producción de gas de la ración analizada; Sin embargo, hicieron cambios cualitativos en los gases producidos y mejoraron las condiciones ambientales. *S. cerevisiae* y xilanasa disminuyeron la producción de CH<sub>4</sub>, que es muy importante desde el punto de vista ambiental, por lo que estos aditivos pueden ser utilizados como una estrategia sostenible para reducir los gases de efecto invernadero del ganado. Se necesitan más investigaciones para probar más dosis de los aditivos tanto en estudios in vitro como in vivo para validar o negar los presentes resultados y para determinar si estos aditivos podrían ser utilizados como aditivos para la alimentación para mejorar las condiciones ambientales y afectar la utilización de pienso y CH<sub>4</sub> Producción en ganado lechero y de carne, cabras y novillos. Conflicto de intereses. Todos los autores declaran que no existen conflictos de interés actuales o potenciales entre los autores y otras personas u organizaciones que pudieran sesgar de manera inapropiada su trabajo.

## 10. REFERENCIAS

- 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 J. Anim. Sci.* 49, 32-43.
- Ahmed, M.H., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Zeweil, H.S., Kholif, A.E., Klieve, A.V., Abdelrassol, A.M.A., 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. *Livest. Sci.* 180, 90-97.
- Ammar, H., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ovejero, F.J., Gonzalez, J.S. Lopez, S. 2004. Effect of inoculum source (sheep or goat rumen fluid) on in vitro digestibility and gas production kinetics of the foliage of some Spanish browse plants. *Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneenes. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques 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., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81, E37-E47.
- Blümmel, M., Steingss, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and <sup>15</sup>N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77, 911–921.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., Fievez, V., 2007. In vitro examination of DHA-edible micro algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 136(1), 63-79.
- 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, 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* (Vol. 13, pp. 151-156).

- Callaway, E.S., Martin, S.A., 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80, 2035-2044.
- Chung, Y.H., Zhou, M., Holtshausen, L., Alexander, T.W., McAllister, T.A., Guan, L.L., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2012. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. *J. Dairy Sci.* 95, 1419–1427.
- Corona, L., Mendoza, G.D., Castrejón, F.A., Crosby, M.M., Cobos, M.A., 1999. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. *Small Rumin. Res.* 31(3), 209-214.
- Elghandour M.M.Y., Kholif, A.E., Hernández, J., Mariezcurrena, M.D., López, S., Camacho, L.M., Márquez, O., Salem, A.Z.M., 2016b. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. *Czech J. Anim. Sci.* 61 (6), 262–272.
- Elghandour, M.M., Chagoyán, J.C.V., Salem, A.Z., Kholif, A.E., Castañeda, J.S.M., Camacho, L.M., Cerrillo-Soto, M.A., 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital. J. Anim. Sci.* 13(2), 295-301.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Marquez-Molina, O., Vazquez-Armijo, J.F., Puniya, A.K., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on in vitro rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39(4), 435-442.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A., 2016a. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194–200.
- Elghandour, M.M.Y., 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, 389-395,
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006. Livestock a Major Threat to the Environment: Remedies Urgently Needed. [accessed 26 December 2016]. Available:<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000448/index.html>.



- Fedorak, P.M., Hrudey, S.E., 1983. A simple apparatus for measuring gas-production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4, 425–432.
- 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.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85, 1962–1970.
- 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.
- Hassan, A.A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Samir, M., Yacout, M.H., Hafsa, S.A., Mendoza, G.D., Elghandour, M.M.Y., Ayala, M., Lopez, S., 2016. Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. *J. Agr. Sci.* 154, 1488-1498.
- Hernandez, A., Kholif, A.E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Rodríguez, G.B., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J. Clean. Prod.* 142, 2384–2392.
- 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.
- Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T. W., Harper, M. T., Weeks, H. L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M. H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., Duval, S., 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112(34), 10663–10668.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., Tricarico, J.M., 2013. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal

- operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069.
- Khattab, H.M., Gado, H.M., Kholif, A.E., Mansour, A.M., Kholif, A.M., 2011. The potential of feeding goats sun dried rumen contents with or without bacterial inocula as replacement for berseem clover and the effects on milk production and animal health. *Int. J. Dairy Sci.* 6, 267-277.
- Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara, I.A., Sanchez-Torres, J.E., 2016. In vitro assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J. Equine Vet. Sci.*, 39, 44-50.
- Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, G.B., Olafadehan, O.A., Salem, A.Z.M., 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *J. Clean. Prod.* 142, 2649–2655.
- Kumar, U., Sareen, V.K., Singh, S., 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73, 231e236.
- Lewis, G.E., Sanchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B.I., Treacher R.J., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 611-617.
- Mao H.L., Wu C.H., Wang J.K., Liu J.X., 2013. Synergistic effect of cellulase and xylanase on in vitro rumen fermentation and microbial population with rice straw as substrate. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 13, 477–487.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.-J., 2001. Enzymes in ruminant diets. In: Bedford M., Partridge G. (eds.): *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 273–298.
- 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

- Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z.M., 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann. Anim. Sci.* 16, 209–222.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Berat- Maillet, C., Forano, E., 2007. Quantification by real time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheeps after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates. Effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2676-2685.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123, 31-50.
- Newbold, C.J., Rode, L.M., 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Int. Congr. Ser.* 1293, 138-147.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., McIntosh, F.M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76, 249e261.
- 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(1), 145-153.
- Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y., 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48, 14–20.
- Patra, A.K., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 366- 375.
- Paya, H., Taghizadeh, A., Janmohammadi, H., Moghadam, G.A., 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the in vivo and in vitro gas production techniques. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2, 108- 113.
- Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36–45.

- Rodriguez, M.P., Mariezcurrena, M.D., Mariezcurrena, M.A., Lagunas, B.C., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.M., Kholif, A.E., Almaráz, E.M., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of live cells or cells extract of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro gas production of a total mixed ration. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(4), 590-595.
- Salem, A.Z.M., Alsersy, H., Camacho, L.M., El-Adawy, M.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Rivero, N., Alonso, M.U., Zaragoza, A., 2015. Feed intake, nutrient digestibility, nitrogen utilization, and ruminal fermentation activities in sheep fed *Atriplex halimus* ensiled with three developed enzyme cocktails. *Czech J. Anim. Sci.* 60(4), 185-194.
- Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Buendía, G., Mariezcurrena, M.D., Hernandez, S.R., Camacho, L.M., 2014. Influence of oral administration of *Salixbabylonica* extract on milk production and composition in dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.*, 13(1), 10-14.
- SAS, 2002. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds. P.N. Hobson and C.S. Stewart), Chapman and Hall, London, UK, pp. 10-72.
- Valdes, K.I., Salem, A.Z.M., López, S., Alonso, M.U., Rivero, N., Elghandour, M.M.Y., Domínguez, I.A., Ronquillo, M.G., Kholif, A.E., 2015. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. *J. Agr. Sci.* 153(04), 732-742.
- Vallejo, L.H., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghangour, M.M.Y., Fajardo, R.C., Rivero, N., Bastida, A.Z., Mariezcurrena, M.D., 2016. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. *Indian J. Anim. Sci.* 86(1), 70-74.
- 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.
- Velázquez-Garduño, G., Mariezcurrena-Berasain, M.A., Salem, A.Z., Gutiérrez-Ibañez, A.T., Bernal-Martínez, L.R., Pinzón-Martínez, D.L., Kholif, A.E., Odongo, N.E., Mariezcurrena-Berasain, M.D., 2015. Effect of organic selenium-enriched yeast

supplementation in finishing sheep diet on carcasses microbiological contamination and meat physical characteristics. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(3), p.3836.

Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M., Newbold, C.J., 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016- 3026.

## ANEXO: ARTÍCULO

### Influence of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal biomethane and carbon dioxide emissions in steers

**From:** Italian Journal of Animal Science  
<onbehalfof+rosanna.scipioni+unimore.it@manuscriptcentral.com>  
**To:** asalem70@yahoo.com  
**Cc:** asalem70@yahoo.com  
**Sent:** Friday, 9 June 2017, 17:04  
**Subject:** Italian Journal of Animal Science - Manuscript ID TJAS-2017-0593 has been submitted online

09-Jun-2017

Dear Professor Salem:

Your manuscript entitled "Influence of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal biomethane and carbon dioxide emissions in steers" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Italian Journal of Animal Science.

Your manuscript ID is TJAS-2017-0593.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/tjas> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/tjas>.

Thank you for submitting your manuscript to Italian Journal of Animal Science.

Sincerely,  
Italian Journal of Animal Science

## **Influence of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal biomethane and carbon dioxide emissions in steers**

### **Abstract**

The aim of this study was to study the sustainable mitigation of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) emissions as well as ruminal fermentation kinetics of a high-concentrate ration (basal ration) using inoculum from steers in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, xylanase, and their mixture as environmentally friendly feed additives. Rumen liquor was obtained from two rumen cannulated Holstein steers. The basal ration was supplemented (per g dry matter (DM)) with xylanase at 2 mL, *S. cerevisiae* at 4 mg, or their mixture at 2 mL xylanase + 4 mg *S. cerevisiae*. No inoculum source × additive type interactions were observed ( $P>0.05$ ) in this study. Additives asymptotic GP with no effect on steers inocula. *S. cerevisiae* or/and xylanase decreased ( $P<0.05$ ) the proportional CH<sub>4</sub> with inoculum of steers and higher ( $P<0.05$ ) CO<sub>2</sub> production. Higher ( $P<0.05$ ) bacterial counts were observed with the inclusion of the additives. Short chain fatty acids and metabolizable energy concentrations were normal. Moreover, additives had ( $P<0.05$ ) DM degradability ( $P=0.037$ ). It is concluded that *S. cerevisiae*, xylanase and their mixture did not affect total GP but altered the proportions of the resulting gases. The additives decreased CH<sub>4</sub> production, thus, can be used as an environmental friendly and sustainable strategy to reduce greenhouse gas emissions from livestock and improve the environmental conditions.

Keywords: greenhouse gases, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, in vitro fermentation, xylanase exogenous enzyme, yeast.

## 1. Introduction

In recent years, the earth has become warmer due to the large production of greenhouse gases. Livestock production is responsible for about 18% of methane (CH<sub>4</sub>) emission, and 9% of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) production (FAO, 2006). Methane and CO<sub>2</sub> are the result of ruminal fermentation of feeds, causing losing of 2 to 12% of gross dietary energy (Hristov *et al.*, 2015). Attempts, including the inclusion of *S. cerevisiae* (Elghandour *et al.*, 2017), organic acids salt (Elghandour *et al.*, 2016), exogenous enzymes (Kholif *et al.*, 2017), and essential oils (Hernandez *et al.*, 2017), have been used to mitigate ruminal CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions from ruminant feeds. Based on the energy balances reported by Bruinenberg *et al.* (2002) and Nkrumah *et al.* (2006), reducing CH<sub>4</sub> 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.

Because the European Union has banned the inclusion of antibiotics and ionophores as feed additive in animal feeding, exploring alternative natural feed additives to modify ruminal fermentation and enhance feed utilization (Salem *et al.*, 2014), and reduce the emission of greenhouse gases (GHG; Elghandour *et al.*, 2017; Kholif *et al.*, 2017) had become desirable. Studies have shown that the inclusion of exogenous enzymes in ruminants' feeding improved productive performance of animal by improving nutrient digestibility and ruminal fermentation (Valdes *et al.*, 2015). Researcher has proposed several modes of actions of the improved feed utilization including solubilization of dietary fiber, supplementation of ruminal microorganisms with readily fermentable substrate, enhancement of microbial enzyme activity in the rumen (McAllister *et al.*, 2001), and enhancement of the attachment and colonization of ruminal microorganisms to the plant



cell wall (Chung *et al.*, 2012). However, Lewis *et al.* (1999) observed weak effects of feeding exogenous enzymes to enhance forage quality and utilization by ruminants. The inconsistency may be attributed to the different sources of the enzyme (Khattab *et al.*, 2011), different doses and activities of the enzyme (Morsy *et al.*, 2016), different physical properties of diets (Elghandour *et al.*, 2015), and enzyme application method (Elghandour *et al.*, 2016) and level of animal productivity (Beauchemin *et al.*, 2003).

The inclusion of *S. cerevisiae* yeast offers a great potential for manipulating ruminal fermentation in vitro (Elghandour *et al.*, 2014) and in vivo (Ahmed *et al.*, 2015). *S. cerevisiae* inclusion in the diet of animals enhanced nutritional value of poor quality forages (Ahmed *et al.*, 2015), nutrient digestibility (Hassan *et al.*, 2016), and animal carcass characteristics (Velázquez-Garduño *et al.*, 2015). Rodriguez *et al.* (2015) observed a higher in vitro rumen degradability and gas production (GP) of feed with *S. cerevisiae* addition. However, very few studies have investigated the use of natural feed additives such as *S. cerevisiae* and xylanase on GHG productions. The objective of this study is to determine the effect of *S. cerevisiae*, xylanase and its mixture as environmentally friendly additives in the sustainable mitigation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions, ruminal microbial population and ruminal fermentation of a highly concentrated ration using ruminal inoculum Of bovine. The hypothesis was that using different food additives such as xylanase and yeast *S. cerevisiae* will alter the ruminal microflora, resulting in a better nutritional value of the diet and a decrease in GHG production.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Substrate and treatments**

A total mixed ration (TMR) was prepared as a substrate and contained (per kg DM): 520 g of ground sorghum, 300 g of corn flour, 60 g of soybean meal, 80 g of molasses and 40 g of urea. The chemical composition of the TMR was 963 g of organic matter (OM), 183 g of crude protein (CP), 304 g of neutral detergent fiber (NDF) and 261 g of acid detergent fiber (FDA). TMR without additive was considered as a control treatment. The basal TMR was supplemented (per g of DM substrate) with xylanase to 2 ml, *S. cerevisiae* to 4 mg, or its mixture to 2 ml of xylanase + 4 mg of *S. cerevisiae* per g of DM substrate.

### **2.2. In vitro fermentation and biodegradation**

Rumen inoculum was collected from two rumen cannulated Holstein steers ( $450 \pm 20$  kg body weight (BW)), housed in individual pens and fed on a diet consisting of oat hay and concentrate (PURINA<sup>®</sup>, 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 as per the conditions stipulated in the Official Mexican Standard of technical specifications for the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). Rumen contents were placed in a plastic thermos preheated at 39°C and transport to the laboratory where it was flushed with CO<sub>2</sub>, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a flask with oxygen-free headspace. The rumen content was maintained at a constant temperature of 39°C with a continuous flow of CO<sub>2</sub>.

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

Samples (0.5 g) of the substrate were weighed into 120 mL serum bottles with appropriate addition of the additives (i.e., xylanase or *S. cerevisiae* or their mixture). Consequently, 50 mL of previously prepared rumen liquor and the buffer were added. Bottles were maintained at constant CO<sub>2</sub> flow for 30 sec, and then capped with neoprene plugs and then sealed with aluminum rings. The vials were placed in an incubator (Riossa®, F-51 D, Mexico State, Mexico) at 39°C for 48 h. Additionally, three bottles as blanks (rumen fluid only) were incubated for 48 h. Three incubation runs were performed in three weeks.

Gas production readings were performed at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 and 48 h of incubation using a water displacement apparatus according to Fedorak and Hrudey (1983). The apparatus was designed with a universal support, with a conical funnel, a 100 mL burette and two latex hoses of 0.5 and 1 m in length and 3/8 inch diameter. The vials were punctured with a 16-gauge needle placed at the end of the hose. Gas production (mL) was measured by the displacement of water in the burette.

After 48 h of incubation, 5 ml of gas were taken and stored in the vials with saturated saline solution prepared with 400 g of NaCl in 1 L of distilled water and the pH adjusted accordingly. Two and 5 mL of 20% methyl orange was added as indicator for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>

concentrations determination. The previously prepared saturated saline solution was and stored in 60 mL serological vials without headspace; and neoprene plugs were placed and sealed with aluminum rings, and stored away from light. For the determination of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, 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 CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively.

At the end of incubation at 48 h, the fermentation process was stopped by swirling the bottles in ice for 5 minutes, then the bottles were uncapped and the pH was measured immediately using a pH meter (Thermo Scientific, Orion Star™ A121, Beverly, MA, USA). The contents of the bottles were filtered in to Ankom® Technologies F57 bags (at constant weight), with the aid of a filtration system connected to a vacuum pump. The bottles were rinsed with hot water three times to ensure recovery of all the residue of fermentation. The bags were then dried in a forced air oven set at 55° C for 48 h. Dry matter degradation was calculated by difference between the initial weight of the dried substrate and the weight of the dried residue.

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

### 2.3. Total bacteria and protozoa count

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

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

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

Where:  $\mu$  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 were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), N (#954.01) and ether extract (EE; #920.39) according to AOAC (1997). The TMR were analyzed for NDF content (Van Soest *et al.*, 1991), ADF and lignin (AOAC, 1997; #973.18) using an ANKOM<sup>200</sup> Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) with the use of an alpha amylase and sodium sulfite.

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

## 2.5. Calculations and statistical analyses

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

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

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

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

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

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

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

The partitioning factor at 24 h of incubation ( $\text{PF}_{24}$ ; 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.,  $\text{DMD}/\text{total GP (GP}_{24})$ ) according to Blümmel *et al.* (1997). Gas yield ( $\text{GY}_{24}$ ) 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:

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

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

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

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

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

(6) MCP (mg/g DM) = Milligrams DMD – (Milliliter gas × 2.2 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).

## **2.6. Statistical analyses**

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

## **3. Results**

### **3.1. Gas production**

No inoculum × additive type interactions were observed for all parameters of GP, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> productions (Table 1). The type of feed additive affected (P<0.05) GP and CH<sub>4</sub> production.



**Fig Table 1**

Biogas production (mL/g DM) of a total mixed ration as affected by the addition of xylanase, *S. cerevisiae* yeast and their mixture using rumen liquor from steer

Additive	Gas production parameters				CH <sub>4</sub> production at 48 h of incubation			CO <sub>2</sub> production at 48 h of incubation		
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	mL gas/g degraded DM	mL CH <sub>4</sub> /g incubated DM	Proportional CH <sub>4</sub> production	mL CH <sub>4</sub> /g degraded DM	CO <sub>2</sub> production (mL/g DM) <sup>2</sup>	Proportional CO <sub>2</sub> production	mL CO <sub>2</sub> /g degraded DM
Control	29.2	0.073	5.15	401	221.6	86.0	313.8	36.2	14.0	51.3
Xylanase	29.7	0.075	4.54	402	222.5	83.2	305.7	44.9	16.8	61.7
Yeast	30.0	0.073	4.41	409	224.4	83.6	312.4	44.0	16.4	61.3
Xylanase+yeast	30.3	0.070	4.38	403	227.1	83.6	311.7	44.6	16.4	61.2
SEM	6.5	0.029	0.299	8.3	1.6	0.49	1.80	1.19	1.49	1.60
<i>P</i> -value	0.677	0.595	0.029	0.907	0.404	0.041	0.605	0.069	0.055	0.007

<sup>2</sup>*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).

1 shows GP at different incubation hours and the effect of inoculum and feed additives. The inclusion of *S. cerevisiae*, enzyme or their mixture did not affect ( $P>0.05$ ) the asymptotic GP with steers rumen inoculum. The additives decreased ( $P=0.029$ ) the lag time of GP with steers inoculum.

The additives had no effect on CH<sub>4</sub> production (mL/g DM). However, the additives decreased the proportional CH<sub>4</sub> with steers inoculum ( $P=0.041$ ) inoculum. Inclusion of *S. cerevisiae* and xylanase resulted in higher ( $P<0.05$ ) CO<sub>2</sub> production (mL/g DM) and proportional CO<sub>2</sub> production at 48 h of incubation.

### **3.2. Microbial population**

An interaction between inoculum source and additive type was observed ( $P<0.001$ ) for total protozoal count but there was no interaction ( $P>0.05$ ) for total bacterial count (Table 2). Additive type did not affect ( $P>0.05$ ) both of total bacterial and protozoal counts. However, protozoal count differed ( $P=0.002$ ) among inoculum sources. total bacterial counts were higher ( $P<0.05$ ), while total protozoal counts were not affected ( $P>0.05$ ) by the addition of *S. cerevisiae*, xylanase or their mixture.

**Table 2**

Fermentation kinetics of a total mixed ration as affected by the addition of xylanase, *S. cerevisiae* yeast and their mixture using rumen liquor from steer

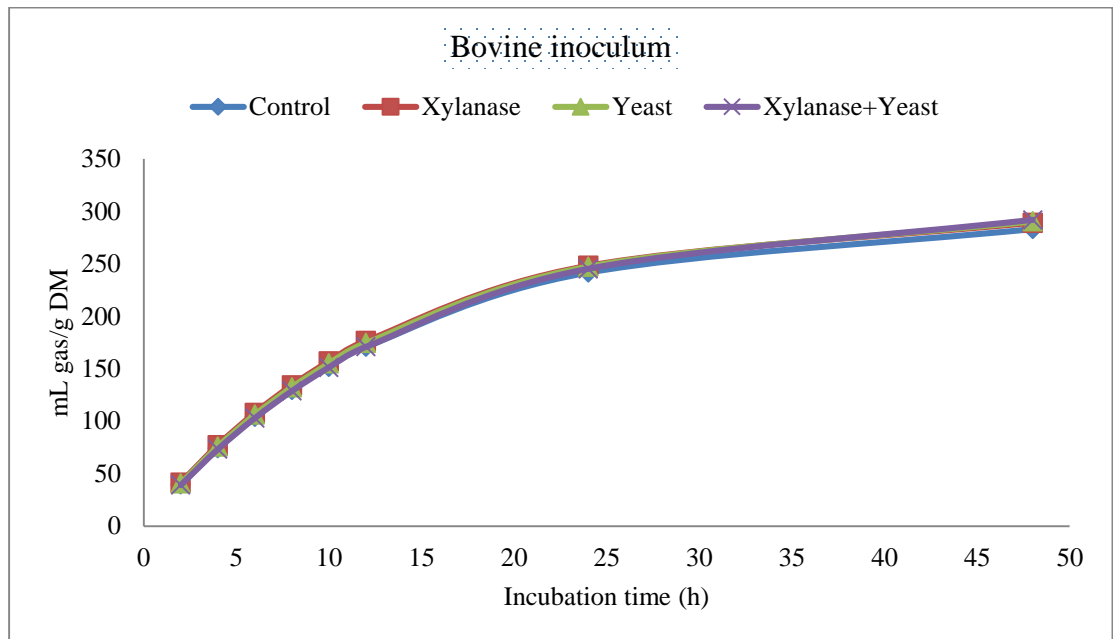
Additive	pH	SCF A	NH <sub>3</sub> - N	DMD	OMD	ME	MCP	Total bacteri a × 10 <sup>8</sup>	Total protozo a × 10 <sup>5</sup>
Control	6.50	5.34	62.2	707	663	9.82	728	7.9	2.89
Xylanase	6.48	5.49	62.5	720	674	9.99	740	11.1	2.23
Yeast	6.48	5.47	57.3	711	673	9.97	738	10.8	2.28
Xylanase+yea st	6.49	5.42	60.7	724	670	9.91	735	11.5	2.16
SEM	0.00 3	0.079	1.33	3.7	6.3	0.09 6	6.6	0.45	0.435
<i>P</i> -value	0.22 2	0.597	0.08 5	0.03 7	0.62 4	0.60 4	0.60 2	0.044	0.170

<sup>1</sup>DMD is dry matter degradability (mg/g DM), MCP is microbial protein production (mg/g DM), ME is metabolizable energy (MJ/kg DM), NH<sub>3</sub>-N is ammonia-N, OMD is in vitro organic matter digestibility (g/kg DM), PF<sub>24</sub> is partitioning factor at 24 h of incubation (mg DMD/mL gas), pH is ruminal pH, SCFA is short-chain fatty acids (mmol/g DM).

### 3.3. Fermentation kinetics

No interactions were observed ( $P > 0.05$ ) between inoculum source and additive type for all measured parameters of fermentation kinetics (Table 2). No effect was observed ( $P > 0.05$ ) with the addition of *S. cerevisiae* or xylanase on ruminal pH, NH<sub>3</sub>-N

concentration, PF24, and GY24. The additives resulted in higher DMD with cows (P=0.037) inocula.



**Fig. 2**

Gas production (mL/g DM) as affected by the inclusion of *S. cerevisiae*, xylanase and their mixture using rumen liquor from bovine.

## 4. Discussion

### 4.1. Gas production

The absence of inoculum source and feed additive type interaction reveals that the effects of additive are not inoculum dependent. Besides, GP parameters differed among goat, sheep and steer inocula revealing that using rumen fluid from different ruminant species for in vitro evaluation of feed is strongly recommended. Aderinboye *et al.* (2016)

observed different fermentation parameters among cows, sheep and goat inocula due to different bacterial and protozoal populations and microbial activity among goats, sheep and steers (Aderinboye *et al.*, 2016). Because ruminal microbial population depends mainly on the type of diet fed and since all the goats, sheep and steers were maintained on the same diet, microbial species were not expected to vary (Mould *et al.*, 2005). Furthermore, Mould *et al.* (2005) reported that other factors including host animal effects, sample preparation and inoculation might cause some variations in microbial species. Ammar *et al.* (2004) also reported other factors which might cause some variations between inocula from different animal species and influence gut microflora, including chewing/eating behavior, gut physiology, compartment dimensions and retention time.

Gas production differed among the tested feed additives. This was expected because each of the additives has a different mode of action to affect ruminal fermentation (Hernandez *et al.*, 2017). However, many reports observed that inclusion of *S. cerevisiae* (Elghandour *et al.*, 2014) and enzymes (Vallejo *et al.*, 2016) resulted in higher GP. *S. cerevisiae* and xylanase had a weak effect on GP with goat and steer inocula but higher GP with sheep inocula. In agreement with the current results, Hernandez *et al.* (2017) observed negligible effects with exogenous xylanase and *S. cerevisiae* on GP kinetics. The different response among rumen liquor donors can be explained based on different ruminal microflora among species, as previously explained.

The additives higher rate of GP and decreased the lag time of GP revealing better nutrients utilization. Recent studies have shown that exogenous enzymes inclusion in diets of ruminants improved feed utilization, digestion of DM and animal performance by improving DM degradation (Morsy *et al.*, 2016). Rodriguez *et al.* (2015) observed that *S.*

*cerevisiae* addition decreased rate of GP. This inconsistency may be due to the composition of the substrates (Elghandour *et al.*, 2014). The lower lag time of GP may be due to higher degradation of feed nutrients especially fibers (Kholif *et al.*, 2016; Elghandour *et al.*, 2017). Exogenous enzymes have the ability to stimulate the initial phases of microbial colonization in the rumen and facilitate the bacterial attachment to feed particles (Giraldo *et al.*, 2007). *S. cerevisiae* was reported to effectively consume O<sub>2</sub> molecules from the rumen making the ruminal environment more commensurate for optimum activity of various microorganisms (Newbold *et al.*, 1996). In addition, Callaway and Martin (1997) reported that *S. cerevisiae* contains small peptides and many important nutrients required for the growth and activity of ruminal microorganisms especially ruminal cellulolytic bacteria to initiate the fermentation process (Paya *et al.* 2007). Williams *et al.* (1991) reported a stimulation effect of *S. cerevisiae* on cellulose degradation, which was associated with a lower lag time and higher initial rates of digestion, without affecting the extent of ruminal digestion. Lowering the lag time of GP with xylanase and *S. cerevisiae* reveals the ability of these additives to overcome the problem of low intakes and slow digestion of low quality forages (Salem *et al.*, 2015).

#### **4.2. Greenhouse gases**

The production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> differed among cows inocula, which may be due to different ruminal microflora population. Hook *et al.* (2010) observed different CH<sub>4</sub> production from different ruminant species. Boeckaert *et al.* (2007) reported that ruminal protozoal population varied from animal-to-animal, despite the feeding of the same diets. The different CH<sub>4</sub> production among ruminal species indicates that one species could not be used to predict CH<sub>4</sub> production (Bueno *et al.*, 2005) for another species. As previously

shown, enteric CH<sub>4</sub> emission contributes to a loss of net feed energy (Hristov *et al.*, 2015). Therefore, intensive research efforts have recently been directed towards mitigation of CH<sub>4</sub> production from ruminants (Elghandour *et al.*, 2016b). During the ruminal fermentation process within the rumen, gases consisting of mainly CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> are produced. Therefore, the unaffected GP and lower proportional CH<sub>4</sub> production reveals that the additives were effective to reduce CH<sub>4</sub> production, and may serve as efficient methods to reduce CH<sub>4</sub> emission from ruminants. Polyorach *et al.* (2014) observed that *S. cerevisiae* supplementation decreased *in vitro* CH<sub>4</sub> production, which supports the current findings. Moreover, Salem *et al.* (2015) and Kholif *et al.* (2016) also observed that the addition of enzymes lowered CH<sub>4</sub> production in equine diets. In ruminant nutrition, xylanase was not expected to reduce CH<sub>4</sub> production because it has been shown that xylanase increases the availability of hemicellulose and therefore CH<sub>4</sub> production (Elghandour *et al.*, 2016b). However, the reasons for this are unclear. The lowered CH<sub>4</sub> production can be explained based on the ability of xylanase to stimulate the reductive acetogens in the rumen that alters H<sub>2</sub> metabolism and its utilization by methanogens to reduce CH<sub>4</sub> formation and emissions (Stewart *et al.*, 1997).

*S. cerevisiae* lowered CH<sub>4</sub> production because of the ability of *S. cerevisiae* to stimulate the acetogens through its competition and co-metabolization of H<sub>2</sub> with methanogens (Hristov *et al.*, 2013). Moreover, the inclusion of *S. cerevisiae* in the diets of ruminants has been shown to enhance nutrient digestibility (Hassan *et al.*, 2016) and altering SCFA production in the rumen by elevating populations of cellulolytic and amylolytic bacteria in the rumen (Kumar *et al.*, 1997). The full mode of action for reduction of CH<sub>4</sub> production is not clear, because some studies reported increased CH<sub>4</sub> production

with *S. cerevisiae* supplementation (Elghandour *et al.*, 2017). Newbold and Rode (2006) reported a decreased CH<sub>4</sub> production with feeding live *S. cerevisiae* products.

The discussion above, suggests that both of *S. cerevisiae* and xylanase act on the metabolization of H<sub>2</sub> in the rumen because a copious quantity of H<sub>2</sub> is produced and together with CO<sub>2</sub> from the ruminal degradation of organic matter are used to synthesize CH<sub>4</sub> by methanogenic Archaea (Hernandez *et al.*, 2017).

#### **4.3. Microbial population**

Additives did not affect total protozoal counts. Corona *et al.* (1999) and Chung *et al.* (2012) reported that protozoa population were not affected by *S. cerevisiae* and fibrolytic enzyme supplementation administration in rams and cows. *S. cerevisiae* and xylanase resulted in higher total bacterial numbers. Newbold *et al.* (1996) observed that *S. cerevisiae* supplementation increased the total anaerobic and cellulolytic bacteria count. The higher bacterial number with *S. cerevisiae* is a result of providing the incubation medium with important nutrients, nutritional cofactors and vitamins such as biotin and thiamine, which are required for enhancing microbial growth and activity (Callaway and Martin, 1997). Besides, *S. cerevisiae* provides conducive anaerobic conditions to microbial growth (Mosoni *et al.* 2007), making the ruminal environment more suitable for microbial growth. On the other hand, exogenous enzyme, like xylanase, can stimulate ruminal fibrolytic and non-fibrolytic bacteria through releasing of carbohydrates that are readily utilized by the bacteria (Nsereko *et al.* 2002). Higher bacterial numbers with the inclusion of cellulase and xylanase in the incubation medium in vitro was observed by Mao *et al.* (2013).



#### 4.4. Fermentation kinetics

Greater SCFA concentrations were observed with the inclusion of the additives to goat and sheep inocula. Mao *et al.* (2013) reported that the inclusion of *S. cerevisiae* in the diet of ruminant increased total SCFA and propionic acid production. Greater SCFA production and ME concentrations are associated with enhanced activities of ruminal microflora. As previously shown, the higher ruminal bacterial number with the additives is the reason for enhanced ruminal fermentation. At the same time, the improved DMD with sheep and steer inoculum and higher OMD with goat inoculum might be a result of enhanced fungal colonization of plant cell walls resulting in enhanced DM and fiber digestion (Patra, 2012). The greater degradability is related to the ability of xylanase to enhance the attachment and colonization of ruminal microbes to plant cell wall particles (Nsereko *et al.* 2002). Moreover, the inclusion of exogenous enzyme enhances the synergism interaction between endogenous ruminal enzymes and the exogenous enzyme resulting in enhanced nutrient degradability. The enhanced degradability with the inclusion of *S. cerevisiae* may be a result of enhanced ruminal environment with *S. cerevisiae* supplementation (Newbold *et al.*, 1996; Callaway and Martin, 1997). Hernandez *et al.* (2017) reported that the inclusion of *S. cerevisiae* and xylanase did not affect DMD but decreased fermentation kinetics.

#### 5. Conclusion

*S. cerevisiae* and fibrolytic enzyme xylanase did not affect gas production of the tested ration; however, they made qualitative changes in produced gases and improved the environmental conditions. *S. cerevisiae* and xylanase decreased CH<sub>4</sub> production, which is very important from an environmental standpoint, and therefore, these feed

additives can be used as a sustainable strategy to reduce greenhouse gases from livestock. Further research is needed to test more doses of the additives in both in vitro and in vivo studies to validate or negate the present results and to determine whether these additives could be used as feed additives for improving the environmental conditions, and affect feed utilization and CH<sub>4</sub> production in dairy and steers.

### **Acknowledgements**

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

### **6 References**

- 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 J. Anim. Sci.* 49, 32-43.
- Ahmed, M.H., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Zeweil, H.S., Kholif, A.E., Klieve, A.V., Abdelrassol, A.M.A., 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. *Livest. Sci.* 180, 90-97.

- Ammar, H., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ovejero, F.J., Gonzalez, J.S. Lopez, S. 2004. Effect of inoculum source (sheep or goat rumen fluid) on in vitro digestibility and gas production kinetics of the foliage of some Spanish browse plants. *Options Mediterraneennes. Serie A, Seminaires Mediterraneenes. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneens, Montpellier, France.* 59, pp. 121–126.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolyticenzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81, E37-E47.
- Blümmel, M., Steingss, H., Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and <sup>15</sup>N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77, 911–921.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Mestdagh, J., Fievez, V., 2007. In vitro examination of DHA-edible micro algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 136(1), 63-79.
- 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, 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 (Vol. 13, pp. 151-156).*

- Callaway, E.S., Martin, S.A., 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80, 2035-2044.
- Chung, Y.H., Zhou, M., Holtshausen, L., Alexander, T.W., McAllister, T.A., Guan, L.L., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2012. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. *J. Dairy Sci.* 95, 1419–1427.
- Corona, L., Mendoza, G.D., Castrejón, F.A., Crosby, M.M., Cobos, M.A., 1999. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. *Small Rumin. Res.* 31(3), 209-214.
- Elghandour M.M.Y., Kholif, A.E., Hernández, J., Mariezcurrena, M.D., López, S., Camacho, L.M., Márquez, O., Salem, A.Z.M., 2016b. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. *Czech J. Anim. Sci.* 61 (6), 262–272.
- Elghandour, M.M., Chagoyán, J.C.V., Salem, A.Z., Kholif, A.E., Castañeda, J.S.M., Camacho, L.M., Cerrillo-Soto, M.A., 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital. J. Anim. Sci.* 13(2), 295-301.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Marquez-Molina, O., Vazquez-Armijo, J.F., Puniya, A.K., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on in vitro rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39(4), 435-442.

- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A., 2016a. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. *J. Clean. Prod.* 135, 194–200.
- Elghandour, M.M.Y., 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, 389-395,
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006. Livestock a Major Threat to the Environment: Remedies Urgently Needed. [accessed 26 December 2016]. Available:<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000448/index.html>.
- Fedorak, P.M., Hrudey, S.E., 1983. A simple apparatus for measuring gas-production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4, 425–432.
- 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.
- Giraldo, L.A., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2007. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 85, 1962–1970.
- 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.

- Hassan, A.A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Samir, M., Yacout, M.H., Hafsa, S.A., Mendoza, G.D., Elghandour, M.M.Y., Ayala, M., Lopez, S., 2016. Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. *J. Agr. Sci.* 154, 1488-1498.
- Hernandez, A., Kholif, A.E., Lugo-Coyote, R., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Rodríguez, G.B., Odongo, N.E., Salem, A.Z.M., 2017. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. *J. Clean. Prod.* 142, 2384–2392.
- 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.
- Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T. W., Harper, M. T., Weeks, H. L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M. H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., Duval, S., 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112(34), 10663–10668.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., Tricarico, J.M., 2013. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal

operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J. Anim. Sci.* 91, 5045–5069.

Khattab, H.M., Gado, H.M., Kholif, A.E., Mansour, A.M., Kholif, A.M., 2011. The potential of feeding goats sun dried rumen contents with or without bacterial inocula as replacement for berseem clover and the effects on milk production and animal health. *Int. J. Dairy Sci.* 6, 267-277.

Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara, I.A., Sanchez-Torres, J.E., 2016. In vitro assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. *J. Equine Vet. Sci.*, 39, 44-50.

Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, G.B., Olafadehan, O.A., Salem, A.Z.M., 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *J. Clean. Prod.* 142, 2649–2655.

Kumar, U., Sareen, V.K., Singh, S., 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73, 231e236.

Lewis, G.E., Sanchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B.I., Treacher R.J., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 611-617.

- Mao H.L., Wu C.H., Wang J.K., Liu J.X., 2013. Synergistic effect of cellulase and xylanase on in vitro rumen fermentation and microbial population with rice straw as substrate. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 13, 477–487.
- McAllister, T.A., Hristov, A.N., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Cheng, K.-J., 2001. Enzymes in ruminant diets. In: Bedford M., Partridge G. (eds.): *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 273–298.
- 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
- Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z.M., 2016. Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. *Ann. Anim. Sci.* 16, 209–222.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123, 31-50.
- Newbold, C.J., Rode, L.M., 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Int. Congr. Ser.* 1293, 138-147.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., McIntosh, F.M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76, 249e261.
- 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(1), 145-153.

Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y., 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48, 14–20.

Patra, A.K., 2012. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 366- 375.

Paya, H., Taghizadeh, A., Janmohammadi, H., Moghadam, G.A., 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the in vivo and in vitro gas production techniques. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2, 108- 113.

Polyorach, S., Wanapat, M., Cherdthong, A., 2014. Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using in vitro gas production technique. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 36–45.

Rodriguez, M.P., Mariezcurrena, M.D., Mariezcurrena, M.A., Lagunas, B.C., Elghandour, M.M.Y, Kholif, A.M., Kholif, A.E., Almaráz, E.M., Salem, A.Z.M., 2015. Influence of live cells or cells extract of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro gas production of a total mixed ration. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(4), 590-595.

Salem, A.Z.M., Alsersy, H., Camacho, L.M., El-Adawy, M.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Rivero, N., Alonso, M.U., Zaragoza, A., 2015. Feed intake, nutrient digestibility,

- nitrogen utilization, and ruminal fermentation activities in sheep fed *Atriplex halimus* ensiled with three developed enzyme cocktails. Czech J. Anim. Sci, 60(4), 185-194.
- Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Buendía, G., Mariezcurrena, M.D., Hernandez, S.R., Camacho, L.M., 2014. Influence of oral administration of *Salixbabylonica* extract on milk production and composition in dairy cows. Ital. J. Anim. Sci., 13(1), 10-14.
- SAS, 2002. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., 1997. The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem (Eds. P.N. Hobson and C.S. Stewart), Chapman and Hall, London, UK, pp. 10-72.
- Valdes, K.I., Salem, A.Z.M., López, S., Alonso, M.U., Rivero, N., Elghandour, M.M.Y., Domínguez, I.A., Ronquillo, M.G., Kholif, A.E., 2015. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. J. Agr. Sci. 153(04), 732-742.
- Vallejo, L.H., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghangour, M.M.Y., Fajardo, R.C., Rivero, N., Bastida, A.Z., Mariezcurrena, M.D., 2016. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. Indian J. Anim. Sci. 86(1), 70-74.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M., Newbold, C.J., 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. J. Anim. Sci. 69:3016- 3026.