

CONCENTRACIONES DE SELENIO QUE INHIBEN LA ACTIVIDAD MICROBIANA RUMINAL DURANTE LA FERMENTACIÓN *in vitro* DE HENO DE AVENA

INHIBITORY EFFECT OF SELENIUM CONCENTRATIONS ON MICROBIAL ACTIVITY DURING OAT HAY *in vitro* RUMEN FERMENTATION

Isaac Almaraz-Buendía¹, O. Enrique Del Razo-Rodríguez^{1*}, J. Armando Salinas-Martínez¹, Rafael Campos-Montiel¹, Efrén Ramírez-Bribiesca²

¹Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Rancho Universitario. Avenida Universidad Km. 1, Ex-Hacienda de Aquetzalpa, 43600. Tulancingo, Hidalgo. (oscardelraza@hotmail.com). ²Ganadería, Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

El selenio (Se) se ha suministrado a rumiantes en concentraciones superiores a la establecida como máxima tolerable, pero su efecto en la fermentación ruminal se ha documentado poco. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de Se adicionado en la fermentación *in vitro* de heno de avena. Los tratamientos fueron: testigo, Se20, Se40, Se60 y Se80 correspondientes a 0, 20, 40, 60 y 80 mg Se kg⁻¹ MS en el sustrato, como selenito de sodio. La incubación de 500 mg de heno se realizó con 40 mL de medio de cultivo (líquido ruminal, soluciones minerales, solución amortiguadora, resazurina y solución reductora) a 39 °C por 72 h, con la técnica de producción de gas. Las variables fueron: volumen de gas acumulado (VAG), cinética de producción de gas (volumen máximo (V), tasa de producción de gas (S) y tiempo de retardo (L)), metano (CH₄), pH, degradación de la materia seca (DMS), ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃). El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas, con siete repeticiones independientes por tratamiento y los datos se analizaron con el procedimiento MIXED de SAS[®]. Cuando el heno se fermentó con Se60 y Se80 el pH fue mayor y VAG, V, S y CH₄ fueron menores respecto a los otros tratamientos (p ≤ 0.05). El Se adicionado no afectó DMS, AGV y N-NH₃ (p > 0.05), pero estas variables disminuyeron linealmente con la concentración mayor del microelemento (p ≤ 0.05). La actividad microbiana durante la fermentación *in vitro* de heno de avena se mantuvo constante con 20 y 40 mg Se kg⁻¹ MS, y la última concentración

ABSTRACT

Selenium (Se) has been supplied to ruminants in concentrations higher than that of their established tolerable maximum, but its effects on the ruminal fermentation are scarcely documented. Our objective of this study was to evaluate the effect of Se added to *in vitro* fermentation of oats hay. The treatments were: control, Se20, Se40, Se60 and Se80 which correspond to 0, 20, 40, 60 and 80 mg Se kg⁻¹ MS sodium selenite in the substrate. Oat hay samples (500 mg) were incubated with 40 mL of culture media (rumen fluid, mineral solutions, buffer solution, resazurin and reducing solution) at 39 °C for 72 h, using the gas production technique. The evaluated variables were: accumulated gas volume (AGV), gas production kinetics (maximum volume (V), gas production rate (S) and delay time (L)), methane (CH₄), pH, degradation of dry matter (DMS), volatile fatty acids (VFA) and ammoniacal nitrogen (N-NH₃). The completely randomized experimental design with repeated measures had seven independent repetitions per treatment. The data were analyzed with the MIXED procedure in the SAS[®] software. Oat hay fermented with Se60 and Se80 had higher pH and lower AGV, V, S, and CH₄ compared to the other treatments (p ≤ 0.05). Se addition did not affect DMS, VFA or N-NH₃ (p > 0.05), but these variables linearly decreased with the highest microelement concentrations (p ≤ 0.05). The microbial activity during the *in vitro* fermentation of oat hay kept constant with 20 and 40 mg Se kg⁻¹ MS; the last concentration may be the maximum limit that guarantees the appropriate *in vitro* fermentation.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: diciembre, 2016. Aprobado: julio, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 511-521. 2018.

Key words: sodium selenite, degradation, gas production, methane, volatile fatty acids, ammonia nitrogen.

puede ser el límite máximo que garantice la fermentación *in vitro* apropiada.

Palabras clave: selenito de sodio, degradación, producción de gas, metano, ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal.

INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un microelemento esencial para los animales porque forma parte de la selenocisteína, que es un aminoácido de proteínas óxido reductoras (Stock y Rother, 2009). El consumo deficiente de Se altera el metabolismo de las hormonas tiroideas y la respuesta inmune, provoca patologías musculares y desórdenes reproductivos (Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010). La inclusión de Se en la dieta, el uso de comprimidos intraruminales y las soluciones inyectables son prácticas recomendadas en las regiones con deficiencia del microelemento (Hernández-Calva y Ramírez-Bribiesca, 2006; Revilla-Vázquez *et al.*, 2008).

Los rumiantes requieren de 0.1 a 0.3 mg kg⁻¹ MS de Se (NRC, 2001; NASEM, 2016), el requerimiento varía con el peso vivo y el tipo de dieta (NRC, 2007). Los ovinos y caprinos son susceptibles a la deficiencia del microelemento (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001; Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2004), porque los microorganismos ruminales reducen la forma inorgánica a formas poco disponibles (Se elemental y selenuro) para el rumiante, como mecanismo de conservación de energía y para evitar la selenosis (Nancharaiah y Lens, 2015), o lo incorporan en proteína microbiana como selenoaminoácidos (Mainville *et al.*, 2009; Panev *et al.*, 2013). El efecto del Se adicionado en la fermentación ruminal y el uso de nutrientes con concentraciones cercanas a las requeridas ha sido variable (Serra *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Del Razo-Rodríguez *et al.*, 2013).

Ovinos en etapas fisiológicas diferentes han recibido dietas con Se en concentraciones superiores a la máxima tolerable (5 mg kg⁻¹ MS; NRC, 2005). El suministro de 10, 20 y 40 mg Se kg⁻¹ MS, como selenito de sodio, no provocó selenosis ni efectos negativos en el peso vivo de ovinos (Cristaldi *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2006a; Davis *et al.*, 2006b; Davis *et al.*, 2008); pero, la información del efecto de concentraciones altas de Se en la fermentación ruminal y degradación de la materia seca (DMS) es limitada (Datt *et al.*, 2013; Eun *et al.*, 2013).

INTRODUCTION

Selenium (Se) is an essential microelement for animals because it is part of the selenocysteine, an oxide-reducing proteins amino acid (Stock and Rother, 2009). Se deficient consumption alters the metabolism of thyroid hormones and the immune response, causes muscle pathologies and reproductive disorders (Hefnawy and Tórtora-Pérez, 2010). Adding Se in the diet, intraruminal bolus and injectable solutions, are recommended practices in regions with microelement deficiency (Hernández-Calva and Ramírez-Bribiesca, 2006; Revilla-Vázquez *et al.*, 2008).

Ruminants require between 0.1 to 0.3 mg kg⁻¹ MS of Se (NRC, 2001; NASEM, 2016), the requirement varies with the weight and type of diet (NRC, 2007). Oviene and caprine livestock are susceptible to microelement deficiency (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001; Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2004), because ruminal microorganisms reduce the inorganic form to unavailable forms to ruminants (elemental Se and selenide) as a mechanism of energy conservation and to avoid selenosis (Nancharaiah and Lens, 2015), or incorporate it into microbial protein such as selenoaminoacids (Mainville *et al.*, 2009; Panev *et al.*, 2013). The effects of its addition in ruminal fermentation, and the addition of nutrients concentrations close to those required have been variable (Serra *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Del Razo-Rodríguez *et al.*, 2013).

Sheep in different physiological stages have received diets with Se concentrations above their tolerable maximum (5 mg kg⁻¹ MS; NRC, 2005). The supply of 10, 20 and 40 mg Se kg⁻¹ MS, as sodium selenite, reports no selenosis or negative effects on the live weight in sheep (Cristaldi *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2006a, Davis *et al.*, 2006b; Davis *et al.*, 2008). However, information on the effects of high Se concentrations on ruminal fermentation and dry matter degradation (DMD) is limited (Datt *et al.*, 2013; Eun *et al.*, 2013).

Therefore, we hypothesized that the Se added as sodium selenite in concentrations higher than the ruminant's tolerable maximum affects the *in vitro* fermentation and the DMD. The aim of this study was to evaluate the effect of Se in the gas production, CH₄, pH, DMD, volatile fatty acids (VFA) concentration and ammoniacal nitrogen (N-NH₃) during *in vitro* oat hay fermentation.

Por lo anterior, la hipótesis fue que el Se, adicionado como selenito de sodio, en concentraciones superiores a la máxima tolerable para rumiantes afecta la fermentación *in vitro* y la DMS. Por tanto, el objetivo fue evaluar el efecto del Se en la producción de gas, CH₄, pH, DMS y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃), durante la fermentación *in vitro* de heno de avena.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se realizó en los laboratorios de Nutrición Animal y de Análisis Especiales, del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), en Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

Tratamientos

Los tratamientos fueron: testigo, Se20, Se40, Se60 y Se80, que correspondieron a la cantidad de Se adicionado al sustrato (0, 20, 40, 60 y 80 mg Se kg⁻¹ MS). Cada tratamiento tuvo siete repeticiones independientes y la unidad experimental fue un frasco con 500 mg de sustrato. La concentración del microelemento en cada tratamiento se obtuvo a partir de una solución base con 99 mg Se L⁻¹ (220 mg de selenito de sodio grado alimenticio; 45 % de Se 1000 mL⁻¹); 500 µL de soluciones con 20, 40, 60 y 80 mL aforadas a 100 mL se adicionaron a los frascos, según el tratamiento y agua destilada para el testigo.

Fermentación *in vitro*

La fermentación *in vitro* se realizó con la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994). El medio de cultivo contenía 225 mL de solución amortiguadora (4 g de NH₄HCO₃ (Meyer) y 35 g de NaHCO₃ (Meyer), en 1000 mL), 225 mL de solución macromineral (5.7 g de Na₂HPO₄ (Meyer), 6.2 g de KH₂PO₄ (Meyer) y 0.6 g de MgSO₄ • 7H₂O (Sigma), en 1000 mL), 100 mL de líquido ruminal y 450 mL de agua destilada, por cada 1000 mL. Además, se agregaron 100 µL de una solución micromineral (13.2 g de CaCl₂ • 2H₂O (Sigma), 10 g de MnCl • 4H₂O (Sigma), 1 g de CoCl • 6H₂O (Meyer) y 8 g de FeCl₃ (Meyer), en 100 mL), 1.2 mL de resazurina al 0.1 % y una solución reductora (0.57 g de Na₂SO₄ y 4 mL de NaOH 0.1 N, en 100 mL), en proporción 2 mL: 60 mL del medio. Los componentes del medio se mezclaron con agitación, a 39 °C y flujo constante de dióxido de carbono (CO₂).

MATERIALS AND METHODS

Location

The study took place at the Animal Nutrition and Special Analysis laboratories of the Institute of Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), at Tulancingo de Bravo, Hidalgo state (central Mexico).

Treatments

The treatments were: control, Se20, Se40, Se60 and Se80, which correspond 0, 20, 40, 60 and 80 mg Se kg⁻¹ MS of Se added to the substrate. Each treatment had seven independent repetitions, and the experimental unit was a 500 mg substrate jar. The concentration of the microelement in each treatment was obtained from a base solution with 99 mg Se L⁻¹ (220 mg of food grade sodium selenite, 45 % of Se 1000 mL⁻¹); 500 µL of the solutions with 20, 40, 60 and 80 mL graduated to 100 mL were added to the jars according to each treatment, and distilled water for the control.

In vitro fermentation

The *in vitro* fermentation was carried out following a gas production technique (Theodorou *et al.*, 1994). The culture medium contained 225 mL buffer solution (4 g NH₄HCO₃ (Meyer) and 35 g of NaHCO₃ (Meyer), in 1000 mL), 225 mL macromineral solution (5.7 g Na₂HPO₄ (Meyer), 6.2 g of KH₂PO₄ (Meyer) and 0.6 g of MgSO₄ • 7H₂O (Sigma), in 1000 mL), 100 mL ruminal fluid and 450 mL distilled water, per 1000 mL. In addition to 100 µL of a micromineral solution (13.2 g of CaCl₂ • 2H₂O (Sigma), 10 g of MnCl • 4H₂O (Sigma), 1 g CoCl • 6H₂O (Meyer) and 8 g FeCl₃ (Meyer), in 100 mL), 1.2 mL 0.1 % resazurin and a reducing solution (0.57 g Na₂SO₄ and 4 mL NaOH 0.1 N, in 100 mL), on a 2 mL: 60 mL proportion of the media. The media components were mixed with agitation, at 39 °C and constant carbon dioxide (CO₂) flow.

Ruminal fluid was obtained from two sheep with cannulas (Suffolk x Rambouillet, 2 years old), filtered through three sky blanket layers and kept at 39 °C until use. The sheep were fed oat hay (free access) and 500 g d⁻¹ commercial feed with 15 % crude protein. The surgical placement of cannulas was authorized by the Institutional Committee of Ethics for Care and Use of Laboratory Animals of the UAEH. The care before and after the surgery was carried out following the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999, which establishes the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals (DOF, 2001).

El líquido ruminal se obtuvo de dos ovejas con cánulas (Suffolk x Rambouillet, 2 años de edad), se filtró a través de tres capas de manta de cielo y se mantuvo a 39 °C hasta su uso. Las ovejas se alimentaron con heno de avena (libre acceso) y 500 g d⁻¹ de alimento comercial con 15 % de proteína cruda. La colocación quirúrgica de las cánulas fue autorizada por el Comité Institucional de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAEH. Los cuidados antes y después de la cirugía se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (DOF, 2001).

La fermentación del sustrato (partícula de 1 mm, humedad de 13.5 % y PC de 9.4 %) se realizó en frascos de vidrio transparente (120 mL de capacidad y boca de 20 mm). 40 mL del medio de cultivo se agregaron a cada frasco con flujo constante de CO₂ por 15 s. El sellado hermético de los frascos se obtuvo con tapones de silicón y casquillos de aluminio colocados con una engarzadora manual (Wheaton, E-Z Crimper, USA). La incubación fue a 39 °C en baño María (Thermo Scientific, 2864, USA) por 72 h. Tres frascos sin sustrato (blancos) se incluyeron para medir el volumen de gas producido por la digesta del inóculo; este se restó al producido por la fermentación de las muestras.

Producción de gas y CH₄

El volumen parcial de gas se registró, por desplazamiento de agua (Ramirez-Bribiesca *et al.*, 2011) 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 24, 32, 48 y 72 h después de la incubación y sirvió para calcular el volumen acumulado de gas (VAG; mL g⁻¹ MS). Las variables de la cinética de la producción de gas fueron V: volumen máximo (mL g⁻¹ MS), S: tasa de producción (h⁻¹) y L: tiempo de retardo (h); estas se calcularon con el modelo estadístico de Schofield y Pell (1995) $V_a = V / (1 + e^{-2.4S(t-L)})$ con el procedimiento NLIN de SAS[®] (SAS Institute Inc., 2012).

Las muestras de CH₄ se extrajeron de dos frascos por tratamiento con una jeringa desechable (5 mL y aguja de 21 G x 32 mm), antes de la lectura de las 9, 12, 24, 32 y 48 h de incubación. Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio transparente (15 mL de capacidad y boca de 20 mm), que se llenaron previamente con solución salina saturada (6 N, pH 2 ajustado con HCl concentrado y rojo de metilo como indicador), sellados herméticamente con tapón de silicón y casquillo de aluminio. La muestra se inyectó en los frascos a través del tapón, permitiendo el desplazamiento de la solución a través de una aguja. Las muestras se conservaron en refrigeración (4 °C) con los frascos invertidos hasta su análisis.

La concentración de CH₄ se determinó en 200 μL de la muestra inyectados en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer,

The substrate' fermentation (particle of 1 mm, humidity of 13.5 % and PC of 9.4 %) was carried out in transparent glass jars (120 mL capacity and 20 mm mouth). 40 mL of the culture medium were added to each vial with a constant CO₂ flow for 15 s. The bottles hermetically sealed with silicon plugs and aluminum caps placed with a manual crimper (Wheaton, E-Z Crimper, USA). The incubation was carried out at 39 °C in a water bath (Thermo Scientific, 2864, USA) for 72 h. Three bottles without substrate (blanks) were included to measure the gas volume produced by the inoculum digestion; this was subtracted from that produced by the fermentation of the samples.

Gas and CH₄ production

Gas partial volume was recorded *via* water displacement at (Ramirez-Bribiesca *et al.*, 2011) 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 24, 32, 48 and 72 h after the incubation and used to calculate the accumulated gas volume (AGV; mL g⁻¹ MS). The assessed variables of the gas production kinetics were V: maximum volume (mL g⁻¹ MS), S: production rate (h⁻¹) and L: delay time (h); these were calculated with the Schofield and Pell statistical model (1995) $V_a = V / (1 + e^{-2.4S(t-L)})$ with the NLIN procedure in the SAS[®] statistical procedure (SAS Institute Inc., 2012).

CH₄ samples were extracted from two bottles by treatment with disposable syringes (5 mL and 21 G x 32 mm needle) before the assessments at 9, 12, 24, 32 and 48 h of incubation. The samples were stored in clear glass jars (15 mL capacity 20 mm mouth wide) previously filled with a saturated saline solution (6 N, pH 2 adjusted with concentrated HCl and methyl red as indicator), hermetically sealed with a silicone plug and an aluminum cap. The samples were then injected into the bottles through the stopper, allowing the solution to move through the needle. The samples were kept refrigerated (4 °C) with the jars until analysis.

The CH₄ concentration was determined from a 200 μL sample injected in a gas chromatograph (Perkin Elmer, Autosystem XL, USA) equipped with a methanizer, flame ionization detector (FID) and capillary column (Elite Plot Q 30 mx 0.53 mm, GC Series, USA). The analysis conditions were: 200 °C in the detector and injector, and 50 °C and in the furnace; during 5 minutes run time. The concentration was calculated using a standard curve constructed with increasing CH₄ concentrations (30, 50 and 100 %) and used to calculate the accumulated CH₄ volume.

DMD and VFA and N-NH₃ analysis

At the end of the fermentation, samples were kept for 2 h at 4 °C to stop microbial activity. The pH was then recorded with

Autosystem XL, USA), equipado con metanizador, detector de ionización de flama (FID) y columna capilar (Elite Plot Q 30 m x 0.53 mm, Series GC; USA). Las condiciones del análisis fueron 200 °C en el detector e inyector y 50 °C en el horno; 5 min fue el tiempo de corrida. La concentración se calculó mediante una curva estándar construida con concentraciones crecientes de CH₄ (30, 50 y 100 %) y se utilizó para calcular el volumen acumulado de CH₄.

DMS y análisis de AGV y N-NH₃

Al final de la fermentación, las muestras se mantuvieron 2 h a 4 °C para detener la actividad microbiana. El pH se registró con potenciómetro (Hanna Instruments, HI 2211, Rumania). La DMS se estimó con la MS no degradada y recuperada después de centrifugar el contenido de los frascos a 20 980 x g, por 10 min (Hermle, Z 326 K; Alemania) y secar el residuo a 65 °C, por 72 h en un horno (Terlab, TH-45DM, México). La fórmula fue: $DMS = [(PSM - PSMR) / PSM] * 100$; donde PSM: peso seco de la muestra (g) y PSMR: peso seco de la materia residual (g).

La concentración de AGV en los medios se determinó por cromatografía de gases a las 72 h de incubación (Erwin *et al.*, 1961). Para ello, una muestra de 800 µL del contenido líquido de los frascos se mezcló con 200 µL de ácido metafosfórico al 25 % p/v (J. T. Baker). La mezcla se centrifugó a 17 000 x g por 15 min (Thermo Scientific, PICO 17, Alemania) y el sobrenadante se refrigeró a 4 °C hasta su análisis. El cromatógrafo (HP, Agilent 6890, USA) estuvo equipado con una columna capilar de 0.25 mm x 30 m (HP-FFAP, Agilent, USA) y las temperaturas fueron 140, 250 y 240 °C para el horno, detector e inyector, respectivamente. El gas acarreador fue N a 10 psi y el flujo de aire e H₂ fueron 350 y 35 mL min⁻¹. La muestra que se inyectó fue 1 µL.

La concentración de N-NH₃ se determinó por colorimetría (Weatherburn, 1967) en un espectrofotómetro UV/visible (Jenway, 6305, Reino Unido). Para ello, 20 µL del sobrenadante utilizado para AGV se mezclaron con 1 mL de fenol (50 mg Na₂Fe(CN)₅NO•2H₂O (Meyer) y 10 g de fenol (Fermont), en 1000 mL) y 1 mL de hipoclorito de sodio (7.5 g de NaOH (Meyer), 21.3 g de Na₂HPO₄ anhidro (Meyer) y 15 mL de hipoclorito de sodio al 5 %, en 1000 mL). Las muestras se diluyeron con 5 mL de agua destilada después de 30 min de incubación a 37 °C en baño María (Thermo Scientific, 2864, USA) y se leyeron a 630 nm.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas. Los datos de todas las variables se analizaron con el

potentiometer (Hanna Instruments, HI 2211, Romania). The DMD was estimated with the non-degraded DM recovered after centrifuging the jars contents at 20 980 x g, for 10 min (Hermle, Z 326 K, Germany) and drying the residues at 65 °C for 72 h in an oven (Terlab, TH-45DM, Mexico). The formula was: $DMD = [(PSM - PSMR) / PSM] * 100$; where PSM: dry weight of the sample (g) and PSMR: residual material dry weight (g).

VFA concentration in the medium was determined by gas chromatography at 72 h of incubation (Erwin *et al.*, 1961). For this, an 800 µL sample of the liquid content of the jars was mixed with 200 µL 25 % w / v metaphosphoric acid (J.T. Baker). The mixture was then centrifuged at 17 000 x g for 15 min (Thermo Scientific, PICO 17, Germany) and its supernatant stored at 4 °C until analysis. The chromatograph (HP, Agilent 6890, USA) was equipped with a 0.25 mm x 30 m capillary column (HP-FFAP, Agilent, USA). The temperatures for the oven were 140, 250 and 240 °C, detector and injector, each. The carrier gas was N at 10 psi, the air and H₂ flow were of 350 and 35 mL min⁻¹. The injected sample was of 1 µL.

N-NH₃ concentration was determined by colorimetry (Weatherburn, 1967) on a UV / visible spectrophotometer (Jenway, 6305, United Kingdom). For this, 20 µL of the supernatant used for VFA were mixed with 1 mL phenol (50 mg Na₂Fe(CN)₅NO•2H₂O (Meyer) and 10 g of phenol (Fermont), in 1000 mL) and 1 mL sodium hypochlorite (7.5 g NaOH (Meyer), 21.3 g of anhydrous Na₂HPO₄ (Meyer) and 15 mL of 5 % sodium hypochlorite, in 1000 mL). The samples were diluted with 5 mL distilled water after 30 min of incubation at 37 °C in a water bath (Thermo Scientific, 2864, USA) and assessed at 630 nm.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized with repeated measures. The data of all the variables were analyzed with the MIXED procedure in the SAS® software (SAS Institute Inc., 2012), considering the treatment as fixed effect in the statistical model (time was also considered as a fixed effect for VFA and CH₄) and the experimental unit, repetition and experimental error as random effects. The minimum square means were obtained with the LSMEANS procedure; the means comparison were performed for the variables with significant effect on the treatment using PDIFF. The linear and quadratic behavior was determined *via* the ESTIMATE procedure. The repeated means analysis was carried out with the TYPE = SP statement (POW). The level of significance was $p \leq 0.05$.

procedimiento MIXED de SAS® (SAS Institute Inc., 2012), considerando en el modelo estadístico al tratamiento como efecto fijo (el tiempo se consideró también como efecto fijo para VAG y CH_4) y a la unidad experimental, repetición y error experimental como efectos aleatorios. Las medias de cuadrados mínimos se obtuvieron con LSMEANS; la comparación de medias se realizó para variables con efecto de tratamiento significativo utilizando PDIF y el comportamiento lineal y cuadrático se determinó con ESTIMATE. El análisis de medidas repetidas se realizó con el enunciado TYPE=SP(POW). El nivel de significancia fue $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de gas ocurre a consecuencia de la degradación de los carbohidratos por los microorganismos ruminales y los productos resultantes son AGV, CO_2 y CH_4 . El Se adicionado afectó VAG a las 24 y 72 h de incubación ($p \leq 0.05$; Figura 1). Las medias disminuyeron linealmente a las 12, 24 y 32 h, y su disminución fue cuadrática a las 48 y 72 h ($p \leq 0.05$) con concentración mayor del microelemento (Figura 2). Las diferencias entre medias se observaron desde las 12 h de incubación, momento en que el VAG con Se60 fue menor que el generado en los otros tratamientos ($p \leq 0.05$). Después, las

RESULTS AND DISCUSSION

Gas production occurs as result of carbohydrates degradation by ruminal microorganisms. The resulting products are VFA, CO_2 and CH_4 . Se addition affected AGV at 24 and 72 h of incubation ($p \leq 0.05$, Figure 1). Means linearly decreased at 12, 24 and 32 h, and decreased in quadratic way at 48 and 72 h ($p \leq 0.05$) with the higher concentration of the microelement (Figure 2). Differences between means were observed from 12 h of incubation, at which time the AGV with Se 60 was lower than that generated in the other treatments ($p \leq 0.05$). Then, the differences defined the concentrations that affected gas production; Se60 and Se80 treatments produced less AGV (between 11 and 6.9 %) at 48 and 72 h of incubation ($p \leq 0.05$), with no difference between them at 72 h ($p > 0.05$). Results were similar to those observed by Datt *et al.* (2013) with sodium selenite additions to a rice straw and concentrate mixture (40:60) during fermentation; they report lower gas production with 60 and 70 mg Se kg^{-1} MS, at 24 and 48 h of incubation, respect to lower microelement concentrations.

The treatments effect was also observed in the gas production kinetics, in V and S ($p \leq 0.05$), their means

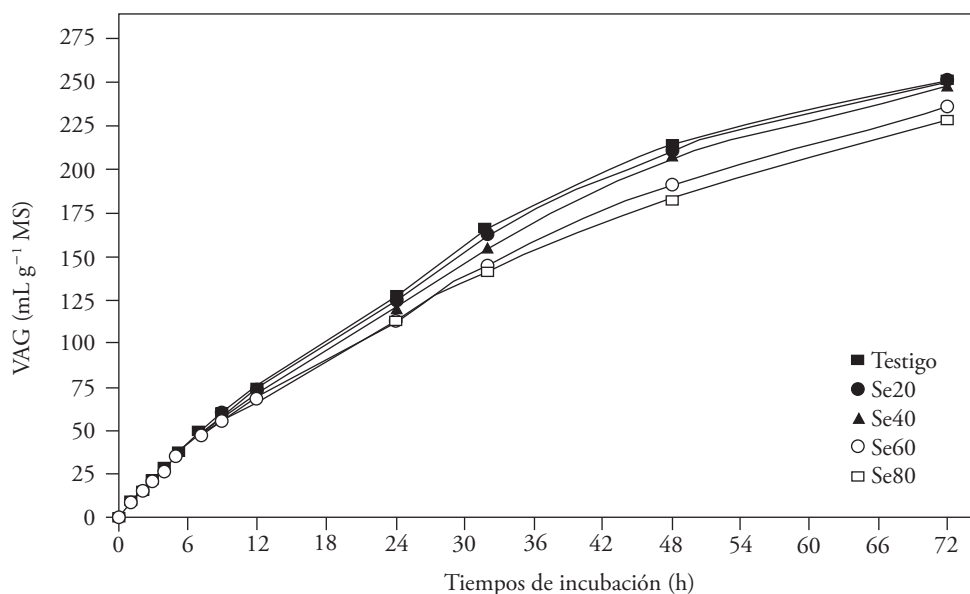


Figura 1. Volumen acumulado de gas (VAG) generado en la fermentación *in vitro* de heno de avena por 72 h, con la adición de selenio de sodio (testigo: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 y Se80: 80 mg kg^{-1} MS).

Figure 1. Accumulated gas volume (AGV) generated at *in vitro* fermentation of oat hay for 72 h with sodium selenite additions (control: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 and Se80: 80 mg kg^{-1} MS).

diferencias definieron las concentraciones que afectaron la producción de gas; los tratamientos Se60 y Se80 produjeron menos VAG (entre 11 y 6.9 %) a las 48 y 72 h de incubación ($p \leq 0.05$), sin diferencia entre ellos a las 72 h ($p > 0.05$). Datt *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares con adición de selenito de sodio a una mezcla de paja de arroz y concentrado (40:60), durante la fermentación; ellos observaron producción menor de gas con 60 y 70 mg Se kg^{-1} MS, a las 24 y 48 h de incubación, respecto a concentraciones menores del microelemento.

El efecto del tratamiento se observó también en la cinética de producción de gas, en V y S ($p \leq 0.05$), y sus medias disminuyeron linealmente con el aumento de Se ($p \leq 0.05$); esto no ocurrió con L ($p = 0.07$; Cuadro 1). El valor de las variables con Se60 y Se80 fue similar entre sí, pero menor que el de los otros tratamientos (excepto Se60 respecto a Se40). Estos resultados permiten inferir que las concentraciones de Se superiores a 40 mg kg^{-1} MS afectan la fermentación *in vitro* del heno de avena y, por tanto, la actividad microbiana, porque la cinética de producción de gas refleja la actividad microbiana en los medios de cultivo (Schofield *et al.*, 1994).

El CH_4 se produce durante la fermentación de carbohidratos en el rumen por la actividad de arqueas como *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. gottschalkii*, *Methanosphaera* spp, *Methanimicrococcus* spp y *Methanobacterium* spp (Hill *et al.*, 2016;

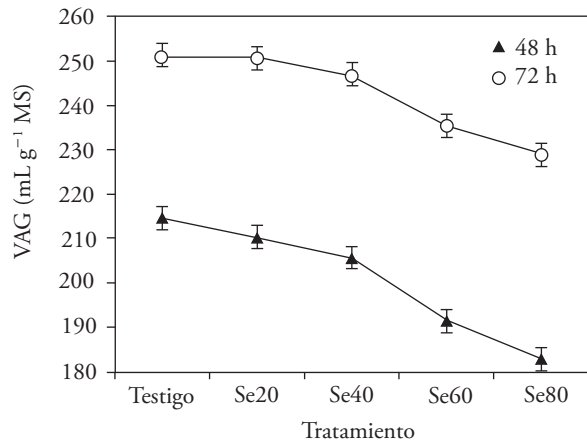


Figura 2. Cambios en el volumen acumulado de gas (VAG) generado en la fermentación *in vitro* de heno de avena a las 48 y 72 h de incubación, con la adición de selenito de sodio (testigo: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 y Se80: 80 mg kg^{-1} MS).

Figure 2. Changes in accumulated gas volume (AGV) generated in oat hay *in vitro* fermentation at 48 and 72 h of incubation with sodium selenite additions (control: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 and Se80: 80 mg kg^{-1} MS).

decreased linearly with the Se increase ($p \leq 0.05$); this did not happen with L ($p = 0.07$; Table 1). The value of the variables on Se60 and Se80 treatments was similar between each other, but lower than that of other treatments (except Se60 with respect to Se40).

Cuadro 1. Variables de la cinética de producción de gas y volumen acumulado de metano (CH_4) obtenidas por fermentación *in vitro* de heno de avena, por 72 h, con adición de selenio (Se).

Table 1. Variables in gas production kinetics and accumulated methane volume (CH_4) obtained in *in vitro* oat hay fermentation at 72 h with selenium (Se) addition.

Variable/tiempo	Tratamientos					EE
	Testigo	Se20	Se40	Se60	Se80	
Variables de la cinética de producción de gas						
V (mL g^{-1} MS) ^{†‡}	244.0a	243.0a	240.5a,b	229.1b,c	221.2c	4.3
S (mL h^{-1}) ^{†‡}	0.0246a	0.0241a	0.0235a,b	0.0227b	0.0220b	0.0005
L (h)	3.00	3.11	3.32	2.93	1.53	0.51
Volumen acumulado de CH_4 (mL g^{-1} MS)						
32 h [†]	6.0	5.8	5.7	4.6	3.9	0.61
48 h ^{††}	9.5a	8.2a	9.3a	7.8a,b	6.4b	0.61

a,b,c Medias con distinta letra en una hilera son diferentes ($p \leq 0.05$). Testigo: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 y Se80: 80 mg Se kg^{-1} MS; EE: error estándar de la media; V: volumen máximo; S: tasa de producción; L: tiempo de retardo; MS: materia seca. [†]Efecto de tratamiento ($p \leq 0.05$). [‡]Tendencia lineal de las medias ($p \leq 0.05$) ♦ a, b, c: Means with different letter in a row are different ($p \leq 0.05$). Control: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 and Se80: 80 mg Se kg^{-1} MS; SE: mean standard error; V: maximum volume; S: production rate; L: delay time; DM: dry matter. [†] Treatment effect ($p \leq 0.05$). [‡] Linear trend of the means ($p \leq 0.05$).

Yang *et al.*, 2016). Las enzimas microbianas implicadas en la producción y utilización de gases de efecto invernadero contienen cofactores metálicos (Glass y Orphan, 2012); el Se es parte de la formato deshidrogenasa que participa en la formación de CH₄ (Stock y Rother, 2009).

El efecto de tratamientos en el volumen acumulado de CH₄ se observó a las 48 h de incubación (p≤0.05), pero no a las 32 h (p=0.06), y las medias disminuyeron linealmente con el incremento en la concentración de Se en ambos tiempos (p≤0.05). Se80 produjo volumen de CH₄ similar al obtenido con Se60 (p>0.05), pero menor al de los otros tratamientos (p≤0.05; Cuadro 1). Con 50 mg Se kg⁻¹ MS (selenato de sodio) adicionado durante la fermentación *in vitro* de heno de pasto ovido (*Dactylis glomerata*), en un sistema de cultivo continuo de doble flujo, no se observaron cambios en la concentración de CH₄ (p=0.10) (Eun *et al.*, 2013). Esto indica que la producción *in vitro* de CH₄ con concentraciones altas de Se puede estar asociada con la concentración y fuente del microelemento y a la técnica utilizada.

Los tratamientos afectaron el pH de los medios a las 72 h de incubación (p≤0.05; Cuadro 2). Con Se40, Se60 y Se80 el pH fue similar (p 0.05), pero fue mayor que en Se20 y el testigo (p≤0.05). El efecto de tratamientos no se observó en DMS (p=0.07) ni en la concentración total de AGV (p=0.10), acetato (p=0.07), propionato (p=0.27), butirato (p=0.06) y N-NH₃ (p=0.64); pero, con una concentración mayor

These results allow us to infer that Se concentrations above 40 mg kg⁻¹ MS affect *in vitro* fermentation of oat hay and therefore microbial activity, because gas production kinetics reflects the microbial activity in the culture media (Schofield *et al.*, 1994).

H₄ is produced during the fermentation of carbohydrates in the rumen by the activity of archaea such as *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. gottschalkii*, *Methanosphaera* spp., *Methanimicrococcus* spp. and *Methanobacterium* spp. (Hill *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2016). The microbial enzymes involved in greenhouse gases production and use contain metallic cofactors (Glass and Orphan, 2012); Se is part of the dehydrogenase format that participates in the formation of CH₄ (Stock and Rother, 2009).

The effect of treatments on the accumulated volume was observed at 48 h of incubation (p≤0.05), but not at 32 h (p=0.06), and means linearly decreased with the increase in Se concentration of in both times (p≤0.05). Se80 produced a CH₄ volume similar to that obtained with Se60 (p>0.05), but lower than that on the other treatments (p≤0.05, Table 1). With 50 mg Se kg⁻¹ MS (sodium selenate) added during *in vitro* fermentation of ball-leaf grass hay (*Dactylis glomerata*), in a continuous double-flow culture system, no changes were observed in the CH₄ concentration (p = 0.10) (Eun *et al.*, 2013).

This indicates that CH₄ *in vitro* production with high Se concentrations may be associated with the concentration and source of the microelement and the technique used.

Cuadro 2. pH, degradación de la materia seca (DMS) y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) obtenidos por fermentación *in vitro* de heno de avena por 72 h, con la adición de selenio (Se).

Table 2. pH, dry matter degradation (DMD) and concentration of volatile fatty acids (VFA) and ammonia nitrogen (N-NH₃) obtained by *in vitro* fermentation of oat hay for 72 h with selenium (Se) addition of selenium.

Variable	Tratamientos					EE
	Testigo	Se20	Se40	Se60	Se80	
pH †‡	6.74a	6.75a	6.77a,b	6.81b	6.82b	0.02
DMS (%) †	61.0	61.7	60.8	59.7	57.8	0.91
AGV total (mMol L ⁻¹) †	46.4	47.0	46.1	44.5	39.7	1.81
Acetato (mMol L ⁻¹) †	30.4	30.6	29.9	28.8	25.8	1.12
Propionato (mMol L ⁻¹)	13.0	13.4	13.3	13.0	11.5	0.64
Butirato (mMol L ⁻¹) †	3.0	3.0	2.9	2.8	2.4	0.13
N-NH ₃	8.5	9.9	8.8	8.3	8.6	0.76

a,b Medias con distinta letra en una hilera son diferentes (p≤0.05). Testigo: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 y Se80: 80 mg Se kg⁻¹ MS; EE: error estándar de la media; MS: materia seca. †Efecto de tratamiento (p≤0.05). ‡Tendencia lineal de las medias (p≤0.05) ♦ a, b, c: Means with different letter in a row are different (p≤0.05). Control: 0, Se20: 20, Se40: 40, Se60: 60 and Se80: 80 mg Se kg⁻¹ MS; SE: mean standard error; V: maximum volume; S: production rate; L: delay time; DM: dry matter. †Treatment effect (p≤0.05). ‡Linear trend of the means (p≤0.05).

de Se las medias (excepto propionato y N-NH₃) disminuyeron linealmente ($p \leq 0.05$). Estos resultados muestran relación con la disminución en la producción de gas con el incremento del Se; además, indican que la producción *in vitro* de AGV tiene correlación positiva con la degradabilidad de la MS y con la producción de gas ($p < 0.05$; Getachew *et al.*, 2004).

El efecto de la adición de concentraciones altas de Se en la DMS y los productos generados no está definido completamente y podría depender de la concentración y fuente de Se, y de la técnica de análisis utilizada. Kim *et al.* (1997) adicionaron *in vitro* 2 mg Se kg⁻¹ MS, a partir de selenito de sodio; ellos no detectaron cambios en la concentración total de AGV, pero observaron una proporción mayor de butirato y menor de acetato. Eun *et al.* (2013) adicionaron 50 mg Se kg⁻¹ MS, utilizando selenato de sodio, pero no encontraron cambios en pH, concentración de AGV y N-NH₃. Xun *et al.* (2012) reportaron cambios positivos en DMS, concentración total de AGV y de N-NH₃ y relación acetato: propionato con la adición de 4 mg Se kg⁻¹ MS, a partir de levadura enriquecida y nano partículas con Se en un estudio *in situ*.

Existen bacterias y arqueas que utilizan selenato y selenito como aceptores finales de electrones durante su respiración anaerobia y forman nanoesferas, que es una forma insoluble de Se. Esta reducción es un mecanismo para prevenir selenosis (Nancharaiah y Lens, 2015). Al respecto, Eun *et al.* (2013) indicaron que las bacterias ruminales se adaptan a concentraciones altas del microelemento, porque detectaron crecimiento de bacterias reductoras de selenato al adicionar 50 mg Se kg⁻¹ MS en el medio. Esto permite explicar porque el suministro de 40 mg Se kg⁻¹ MS en ovinos no provocó selenosis ni cambios en el peso vivo (Davis *et al.*, 2008). Sin embargo, la producción de masa bacteriana tiene correlación negativa ($p < 0.05$) con la concentración de Se en líquido ruminal (Kim *et al.*, 1997), por lo cual la actividad bacteriana puede también disminuir con el aumento en la concentración del microelemento. Así, es posible inferir que las bacterias se adaptaron a las concentraciones de 20 y 40 mg Se kg⁻¹ MS, lo que mantuvo la fermentación constante y la DMS sin cambios.

CONCLUSIONES

La actividad microbiana durante la fermentación *in vitro* de heno de avena se mantuvo constante con

The treatments affected the pH of the media 72 h after incubation ($p \leq 0.05$, Table 2). With Se40, Se60 and Se80 the pH was similar ($p > 0.05$), but higher than the Se20 treatment and the control ($p \leq 0.05$). The effect of the treatments was not observed in the DMD ($p = 0.07$) nor in the total concentration VFA ($p = 0.10$), acetate ($p = 0.07$), propionate ($p = 0.27$), butyrate ($p = 0.06$) and N-NH₃ ($p = 0.64$); but, with a higher concentration of Se the means (except propionate and N-NH₃) decreased linearly ($p \leq 0.05$). These results show a relationship with the decrease in gas production with the increase in Se concentration; furthermore, they indicate that the AGV *in vitro* production is positively correlated with DM degradability and gas production ($p < 0.05$; Getachew *et al.*, 2004).

The effect of the addition of high Se concentrations in the DMD and the generated products is not completely defined, and could depend on the Se concentration and source, and on the analysis technique used. Kim *et al.* (1997) added 2 mg Se kg⁻¹ MS *in vitro* from sodium selenite; they detect no changes in the total VFA concentration, but observed higher butyrate and less acetate proportions. Eun *et al.* (2013) added 50 mg Se kg⁻¹ MS, using sodium selenate, but found no changes in the pH, VFA concentration and N-NH₃. Xun *et al.* (2012) reported positive DMS changes, total VFA concentration, N-NH₃ and acetate:propionate ratio with the addition of 4 mg Se kg⁻¹ MS, from enriched yeast and nanoparticles with Se in a *in situ* study.

There are bacteria and archaea that use selenate and selenite as final electron acceptors during their anaerobic respiration, and form nanospheres which is an insoluble Se form. This reduction is a mechanism to prevent selenosis (Nancharaiah and Lens, 2015). In this regard, Eun *et al.* (2013) indicate that ruminal bacteria adapt to high concentrations of the microelement, because they detected growth of selenate-reducing bacteria by adding 50 mg Se kg⁻¹ MS to the medium. This explains why the supply of 40 mg Se kg⁻¹ MS in sheep did caused no selenosis or changes in their live weight (Davis *et al.*, 2008). However, the production of bacterial mass has a negative correlation ($p < 0.05$) with the Se concentration in ruminal liquid (Kim *et al.*, 1997), so that bacterial activity can also decrease with the increase in the concentration of the microelement. Thus, it is possible to infer that the bacteria adapted

20 y 40 mg Se kg⁻¹ MS, y disminuyó con 60 y 80 mg Se kg⁻¹ MS. El Se agregado no afectó la degradación de materia seca, la concentración de AGV y N-NH₃, aunque mostró reducción lineal en estas variables. Parece que 40 mg Se kg⁻¹ MS es el límite máximo que garantiza la actividad microbiana sin afectar la fermentación ni la degradación *in vitro* de la materia seca de heno de avena.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Pública por la aportación de recursos a través del Programa de Mejoramiento del Profesorado, número de convenio PROMEP/103.5/11/0155. A Víctor Sánchez Oliver, estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por su colaboración en el proyecto como prestador de servicio social.

LITERATURA CITADA

- Cristaldi, L. A., L. R. McDowell, C. D. Buergelt, P. A. Davis, N. S. Wilkinson, and F. G. Martin. 2005. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. *Small Ruminant Res.* 56: 205-213.
- Datt, C., A. Kumar, and S. S. Kundu. 2013. Effect of different levels of added selenium without or with arsenic on rumen fermentation parameters in buffaloes under *in vitro* conditions. *Indian J. Anim. Sci.* 83: 1203-1206.
- Davis, P. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, C. D. Buergelt, R. Van Alstyne, R. N. Weldon, and T. T. Marshall. 2006a. Effects of selenium levels in ewe diets on selenium in milk and the plasma and tissue selenium concentrations of lambs. *Small Ruminant Res.* 65: 14-23.
- Davis, P. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, C. D. Buergelt, R. Van Alstyne, R. N. Weldon, and T. T. Marshall. 2006b. Tolerance of inorganic selenium by range-type ewes during gestation and lactation. *J. Anim. Sci.* 84: 660-668.
- Davis, P. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, C. D. Buergelt, R. Van Alstyne, R. N. Weldon, T. T. Marshall, and E. Y. Matsuda-Fugisaki. 2008. Comparative effects of various dietary levels of Se as sodium selenite or Se yeast on blood, wool, and tissue Se concentrations of wether sheep. *Small Ruminant Res.* 74: 149-158.
- Del Razo-Rodriguez, O. E., J. E. Ramirez-Bribiesca, R. Lopez-Arellano, A. L. Revilla-Vazquez, S. S. Gonzalez-Munoz, M. A. Cobos-Peralta, L. M. Hernandez-Calva, and L. R. McDowell. 2013. Effects of dietary level of selenium and grain on digestive metabolism in lambs. *Czech J. Anim. Sci.* 58: 253-261.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Agosto 22. pp: 107.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
- to concentrations of 20 and 40 mg Se kg⁻¹ MS, which kept the fermentation constant and the DMD unchanged.

CONCLUSIONS

The microbial activity during *in vitro* fermentation of oat hay was kept constant with 20 and 40 mg Se kg⁻¹ MS, and decreased with 60 and 80 mg Se kg⁻¹ MS. The aggregate did not affect the dry matter degradation, the AGV concentration and N- NH₃, although it showed a linear reduction in these variables. It seems that 40 mg Se kg⁻¹ MS is the maximum limit that guarantees microbial activity without affecting the fermentation or *in vitro* degradation of oat hay dry matter.

—End of the English version—



- Eun, J. S., T. Z. Davis, J. M. Vera, D. N. Miller, K. E. Panter, and D. R. ZoBell. 2013. Addition of high concentration of inorganic selenium in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) hay diet does not interfere with microbial fermentation in mixed ruminal microorganisms in continuous cultures. *PAS.* 29: 39-45.
- Getachew, G., P. H. Robinson, E. J. DePeters, and S. J. Taylor. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 111: 57-71.
- Glass, J. B., and V. J. Orphan. 2012. Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. *Front. Microbiol.* 3: 1-20.
- Hefnawy, A. E., and J. L. Tórtora-Pérez. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res.* 89: 185-192.
- Hernández-Calva, L. M., and J. E. Ramírez-Bribiesca. 2006. Diagnosis of selenium status and sodium selenite injection in fighting cattle on the Mexican plateau. *Cuban J. Agr. Sci.* 40: 43-46.
- Hill, J., C. McSweeney, A. D. G. Wright, G. Bishop-Hurley, and K. Kalantar-zadeh. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* 34: 26-35.
- Kim, J., P. J. Van Soest, and G. F. Combs. 1997. Studies on the effects of selenium on rumen microbial fermentation *in vitro*. *Biol. Trace Elem. Res.* 56: 203-213.
- Mainville, A. M., N. E. Odongo, W. J. Bettger, B. W. McBride, and V. R. Osborne. 2009. Selenium uptake by ruminal microorganisms from organic and inorganic sources in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89: 105-110.

- Nanchaiah, Y. V., and P. N. L. Lens. 2015. Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79: 61-80.
- NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine). 2016. *Nutrient Requirements of Beef Cattle* (8th Ed.). The National Academy Press, Washington, DC. 494 p.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7th Ed.). National Academy Press, Washington, DC. 408 p.
- NRC (National Research Council). 2005. *Mineral Tolerance of Animals* (2nd Ed.). National Academy Press, Washington, DC. 510 p.
- NRC (National Research Council). 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids*. National Academy Press, Washington, DC. 384 p.
- Panev, A., K. Hauptmanová, L. Pavlata, A. Pechová, J. Filípek, and R. Dvořák. 2013. Effect of supplementation of various selenium forms and doses on selected parameters of ruminal fluid and blood in sheep. *Czech J. Anim. Sci.* 58: 37-46.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., J. L. Tórtora, L. M. Hernández, and M. Huerta. 2001. Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican plateau. *Small Ruminant Res.* 41: 77-80.
- Ramírez-Bribiesca, E., E. Hernández-Camacho, L. M. Hernández-Calva, y J. L. Tórtora-Pérez. 2004. Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agrociencia* 38: 43-51.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., Y. Wang, L. Jin, T. Canam, J. R. Town, A. Tsang, T. J. Dumonceaux, and T. A. McAllister. 2011. Chemical characterization and *in vitro* fermentation of *Brassica* straw treated with the aerobic fungus, *Trametes versicolor*. *Can. J. Anim. Sci.* 91: 695-702.
- Revilla-Vázquez, A., E. Ramírez-Bribiesca, R. López-Arellano, L. M. Hernández-Calva, J. Tórtora-Pérez, E. García-García, y R. G. Cruz-Monterrosa. 2008. Suplemento de selenio con bolos intrarruminales de selenito de sodio en ovinos. *Agrociencia* 42: 629-635.
- SAS Institute Inc. 2012. *SAS/STAT[®] 12.1 User's Guide*. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 9030 p.
- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 72: 2980-2991.
- Schofield, P., and A. N. Pell. 1995. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: a comparison involving three forages. *J. Dairy Sci.* 78: 2230-2238.
- Serra, A. B., K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto, and T. Fujihara. 1994. Inorganic selenium for sheep II. Its influence on rumen bacterial yield, volatile fatty acid production and total tract digestion of timothy hay. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 7: 91-96.
- Stock, T., and M. Rother. 2009. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. *BBA-Gen. Subjects.* 1790: 1520-1532.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48: 185-197.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974.
- Xun, W., L. Shi, W. Yue, C. Zhang, Y. Ren, and Q. Liu. 2012. Effect of high-dose nano-selenium and selenium-yeast on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Biol. Trace Elem. Res.* 150: 130-136.
- Yang, C., J. A. Rooke, I. Cabeza, and R. J. Wallace. 2016. Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Front. Microbiol.* 7: 1-14.