

# FERMENTACIÓN RUMINAL Y EMISIÓN DE GASES *in vitro* DE DIETAS CON DIFERENTE INCLUSIÓN DE SEMILLA DE GIRASOL (*Helianthus annuus*)

## *In vitro* RUMINAL FERMENTATION AND EMISSION OF GASES OF DIETS WITH DIFFERENT INCLUSION OF SUNFLOWER SEED (*Helianthus annuus*)

Jerónimo Herrera-Pérez<sup>1</sup>, María M. Crosby-Galván<sup>1\*</sup>, José R. Bárcena-Gama<sup>1</sup>, David Hernández-Sánchez<sup>1</sup>, Omar Hernández-Mendo<sup>1</sup>, Nicolás Torres-Salado<sup>2</sup>, Rosy G. Cruz-Monterrosa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo. Estado de México. (maria@colpos.mx). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional km 198, CP. 41940. Cuajinicuilapa Guerrero. México. <sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Avenida Hidalgo Pte. 46, Colonia La Estación, Lerma de Villada, CP. 52006, Estado de México

### RESUMEN

El metano (CH<sub>4</sub>) entérico se produce durante el proceso de fermentación energética y representa una pérdida energética de 2 a 15 %. Las semillas de oleaginosas en la alimentación de rumiantes son una alternativa para disminuir la producción de CH<sub>4</sub>. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar *in vitro* la producción de CH<sub>4</sub>, bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y las características fermentativas en dietas para cordeiros con diferentes niveles de semilla de girasol. Los tratamientos fueron 0 (T1), 6 (T2), 12 (T3) y 18 % (T4) de inclusión de semilla de girasol en la dieta base. En las dietas se evaluó la producción de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, producción de ácidos grasos volátiles (AGV), degradación de la materia seca (DEGMS), fibra detergente neutro (DEGFDN) y fibra detergente ácido (DEGFDA); así como, el conteo total de bacterias (BT) a las 72 h de incubación. El diseño experimental fue completamente al azar y se realizó un análisis de polinomios ortogonales para evaluar los efectos lineal y cuadrático de los tratamientos. Al aumentar el contenido de semilla de girasol en la dieta se disminuyó DEGMS, DEGFDN y DEGFDA (p≤0.05). El contenido de AGV después de 72 h de fermentación mostró una disminución lineal (p≤0.05) al incrementar el contenido de semilla de girasol. La producción de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y el conteo de BT no presentaron diferencias entre tratamientos (p>0.05). Así, el aumento de la semilla de girasol en la dieta disminuye la capacidad de degradación de sus componentes.

### ABSTRACT

Enteric methane (CH<sub>4</sub>) is produced during the process of energetic fermentation and represents an energy loss of 2 to 15 %. The seeds of oleaginous plants in the feed of ruminants are an alternative for reducing the production of CH<sub>4</sub>. Therefore, the objective of the present study was to determine *in vitro* the production of CH<sub>4</sub>, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and the fermentative characteristics in diets for lambs with different levels of sunflower seed. Treatments were 0 (T1), 6 (T2), 12 (T3) and 18 % (T4) of inclusion of sunflower seed in the base diet. The diets were evaluated for production of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, production of volatile fatty acids (VFA), degradation of dry matter (DEGDM), neutral detergent fiber (DEGNDF) and acid detergent fiber (DEGADF), as well as the total bacteria count (TB) at 72 h of incubation. The experimental design was completely randomized, and an analysis of orthogonal polynomials was made to evaluate the linear and quadratic effects of the treatments. When the content of sunflower seed in the diet was increased, there was a reduction of DEGDM, DEGNDF and DEGADF (p≤0.05). The content of VFA after 72 h of fermentation showed a linear reduction (p≤0.05) when the content of sunflower seed was increased. The production of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and TB count did not present differences among treatments (p>0.05). Therefore, increasing the amount of sunflower seed in the diet reduced the degradation capacity of its components.

**Key words:** gas production, methane, *in vitro*, degradation of dry matter, sunflower seed.

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2017. Aprobado: febrero, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 1071-1080. 2018.

**Palabras clave:** producción de gas, metano, *in vitro*, degradación de materia seca, semilla de girasol.

## INTRODUCCIÓN

Las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero (GEI) aumentaron con las actividades antropogénicas (IPCC, 2007), por lo que se consideran precursores del cambio climático (Smith *et al.*, 2007; Kumar, 2012; Hill *et al.*, 2016). La ganadería contribuye con 18 % de las emisiones globales de GEI, y el metano (CH<sub>4</sub>) entérico producido por los rumiantes representa 37 % de la producción antropogénica total (Steinfeld *et al.*, 2006; Key y Tallard, 2012; Kumar *et al.*, 2014). El CH<sub>4</sub> se produce durante la fermentación ruminal de los alimentos y representa de 2 a 15 % de la energía consumida (Kumar *et al.*, 2009; Eckard *et al.*, 2010). La eficiencia de la energía consumida por el rumiante depende de la genética del animal, condiciones ambientales, calidad y cantidad de alimento suministrado (Shibata y Terada, 2010; Kumar *et al.*, 2014).

El uso de semillas oleaginosas en la alimentación de rumiantes se debe al contenido de energía, proteína y ácidos grasos poliinsaturados (Matthäus y Luciana, 2003). Las semillas de oleaginosas, como las de girasol (*Helianthus annuus*), reducen 13 % la emisión de CH<sub>4</sub> (Beauchemin *et al.*, 2009), no afectan la digestibilidad, la fermentación ruminal (Soder *et al.*, 2013; Vanegas *et al.*, 2017), ni el contenido de ácidos grasos en leche de ovejas (Zhang *et al.*, 2006). Chuntrakort *et al.* (2011) mostraron una reducción de 9 % de CH<sub>4</sub> en bovinos al dar un suplemento con semilla de algodón, semilla de girasol y pulpa de coco.

El cambio climático y la pérdida de energía durante la fermentación ruminal de los alimentos aumenta el interés por encontrar diferentes alternativas biotecnológicas que minimicen la producción de CH<sub>4</sub> entérico (Eckard *et al.*, 2010; Patra 2012). Por lo anterior, el objetivo de nuestro estudio fue determinar *in vitro* la producción de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y las características fermentativas en dietas para corderos con diferentes niveles de semilla de girasol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del área de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de Nutrición Animal y Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Posgrado

## INTRODUCTION

The atmospheric concentrations of greenhouse gases (GEI) increased with anthropogenic activities (IPCC, 2007); therefore, they are considered precursors of climate change (Smith *et al.*, 2007; Kumar, 2012; Hill *et al.*, 2016). Livestock production contributes 18 % of the global emissions of GEI, and enteric methane produced by ruminants represents 37 % of the total anthropogenic production (Steinfeld *et al.*, 2006; Key and Tallard, 2012; Kumar *et al.*, 2014). CH<sub>4</sub> is produced during ruminal fermentation of feed and represents 2 to 15 % of the energy consumed (Kumar *et al.*, 2009; Eckhard *et al.*, 2010). The efficiency of the energy consumed by the ruminant depends on the genetics of the animal, environmental conditions, along with quality and quantity of feed supplied (Shibata and Terada, 2010; Kumar *et al.*, 2014).

The use of oilseeds in the feed of ruminants is due to the content of energy, protein and polyunsaturated fatty acids (Matthäus and Luciana, 2003). Oilseeds, such as those of sunflower (*Helianthus annuus*), reduce the emission of CH<sub>4</sub> by 13 % (Beauchemin *et al.*, 2009), and do not affect digestibility, ruminal fermentation (Soder *et al.*, 2013; Vanegas *et al.*, 2017), nor the content of fatty acids in ewes' milk (Zhang *et al.*, 2006). Chuntrakort *et al.* (2011) showed a reduction of 9 % of CH<sub>4</sub> in cattle by giving a supplement with cottonseed, sunflower seed and coconut pulp.

Climate change and the loss of energy during ruminal fermentation of the feed stimulates the interest in finding different biotechnological alternatives that minimize the production of enteric CH<sub>4</sub> (Eckard *et al.*, 2010; Patra, 2012). Therefore, the objective of this study was to determine *in vitro* the production of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and the fermentative characteristics in diets for lambs with different levels of sunflower seed.

## MATERIALS AND METHODS

### Location of the study area

The study was carried out in the laboratories of Animal Nutrition and Ruminal Microbiology and Microbial Genetics of the Graduate Program in Genetic Resources and Productivity – Livestock Production, Campus Montecillo of the Colegio de Postgraduados, State of Mexico.

en Recursos Genéticos y Productividad - Ganadería, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Estado de México.

### Tratamientos

Los tratamientos (Cuadro 1) se elaboraron con base en el National Research Council (NRC, 2007) para cubrir los requerimientos nutricionales de corderos en crecimiento. Los ingredientes antes de elaborar las dietas se molieron en un molino Thomas Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA) con malla de 1 mm.

### Análisis bromatológico

En las dietas experimentales se determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC), cenizas (Ce) y extracto etéreo (EE) según AOAC (2005). La fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) se cuantificaron mediante un analizador ANKOM (200/220, USA) con base en el método de Van Soest *et al.* (1991).

### Medio de cultivo

El medio de cultivo contenía 52.6 mL de agua destilada, 30 mL de líquido ruminal clarificado [filtrado con gasa, centrifugado a 20,817 xg por 15 min en una centrífuga (Eppendorf 5804, Alemania) y se esterilizó 15 min a 121 °C y 15 psi en una autoclave

### Treatments

Treatments (Table 1) were elaborated according to the National Research Council (NRC, 2007) to satisfy the nutritional requirements of growing lambs. The ingredients of the diets were ground in a Thomas Wiley mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, N.J., USA) with a 1 mm mesh prior to the elaboration of the feed.

### Bromatological analysis

Dry matter (DM), crude protein (CP), ash (Ce) and ether extract (EE) were determined according to the AOAC (2005) in the experimental diets. Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were quantified using an ANKOM analyzer (200/220, USA) based on the method of Van Soest *et al.* (1991).

### Culture medium

The culture medium contained 52.6 mL of distilled water, 30 mL of clarified ruminal liquid [filtered with gauze, centrifuged at 20,817 xg for 15 min in a centrifuge (Eppendorf 5804, Germany) and was sterilized for 15 min at 121 °C and 15 psi in an autoclave (Tuttnauer 2540, Israel)], 5 mL of mineral solution I [6 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) per 1000 mL distilled H<sub>2</sub>O], 5 mL of mineral solution II [6 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck); 12 g

**Cuadro 1. Composición y análisis bromatológico de los tratamientos.**  
**Table 1. Composition and bromatological analysis of the treatments.**

Ingredientes	T1	T2	T3	T4
Composición (g kg <sup>-1</sup> MS)				
Alfalfa	100	80	80	80
Maíz grano	500	500	500	520
Rastrojo de maíz	160	150	150	120
Pasta de soya	60	30	30	0
Semilla de girasol	0	60	120	180
Salvado de trigo	160	160	100	80
Premezcla mineral	20	20	20	20
Composición química				
Materia seca, %	93.81	93.25	93.48	93.95
Proteína cruda, %	14.23	14.15	14.47	14.27
Extracto etéreo, %	1.96	1.98	2.06	2.16
Fibra detergente neutro, %	35.65	33.63	34.23	37.82
Fibra detergente ácida, %	18.59	19.59	21.57	22.29
Cenizas, %	7.09	6.71	6.40	6.27

T1= 0 % de semilla de girasol; T2= 6 % de semilla de girasol; T3= 12 % de semilla de girasol; T4= 18 % de semilla de girasol ♦ T1 = 0 % sunflower seed; T2 = 6 % sunflower seed; T3 = 12 % sunflower seed; T4 = 18 % sunflower seed.

(Tuttnauer 2540, Israel)], 5 mL de solución mineral I [6 g  $K_2PO_4$  (Sigma) por 1000 mL  $H_2O$  destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g  $K_2PO_4$ , 6 g  $(NH_4)_2SO_4$  (Merck); 12 g NaCl (Sigma-Aldrich), 2.45 g  $MgSO_4$  (Sigma) y 1.6 g  $CaCl-2H_2O$  (Sigma) por 1000 mL de  $H_2O$  destilada], 5 mL  $Na_2CO_3$  (Merck) en solución 8 % [8 g  $Na_2CO_3$  (Merck) en 100 mL  $H_2O$  destilada], 2 mL solución de sulfito de cisteína [2.5 g L-cisteína (Sigma) disuelta en 15 mL NaOH (2N) y 2.5 g  $Na_2S-9H_2O$  (Meyer) en 100 mL  $H_2O$  destilada], 0.1 mL resazurina al 0.1 % [p/v; 0.1 g resazurina (Sigma-Aldrich) en 100 mL  $H_2O$  destilada], 0.2 g peptona de soya y 0.10 g extracto de levadura (Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta, 2016; Ley-de Coss *et al.*, 2016).

### Trampas para captura de biogás

Los viales trampa se prepararon colocando una solución salina saturada [350 g NaCl (sal común) en 1 L  $H_2O$  destilada y 5 mL naranja de metilo (Meyer) a 0.1 %] en viales serológicos (120 mL). El pH de la solución salina saturada se ajustó con un potenciómetro (Thermo Scientific® Orion 720A) a pH 2 con HCl (2N). Las trampas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso.

### Biodigestores

En viales serológicos (120 mL) se colocaron 0.5 g de muestra de un tratamiento y se esterizaron 15 min a 121 °C y 15 psi. A cada vial se adicionaron 45 mL de medio de cultivo estéril según la metodología de Cobos y Yokoyama (1995), bajo flujo de  $CO_2$ , para mantener condiciones de anaerobiosis. Los biodigestores se colocaron en una incubadora (Riosa® EC-7, México) 72 h a 39 °C, para comprobar esterilidad. Los biodigestores se inocularon con 5 mL de líquido ruminal fresco (se filtró con tres capas de gasa y centrifugó 3 min a 1,257 xg) y se incubaron 72 h a 39 °C.

Los biodigestores se conectaron a un vial trampa mediante una manguera de Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos. En el vial trampa se colocó una aguja (20 G x 32 mm) de manera oblicua como válvula de escape y se colocó invertido sobre una probeta modificada de 50 mL.

### Producción de biogás

La producción de biogás se midió como el desplazamiento de la solución salina saturada a 24, 48 y 72 h de incubación. La proporción de  $CH_4$  y  $CO_2$  se determinó del biogás producido a las 72 h contenido en el vial trampa por cromatografía de gases. Esta se hizo en un cromatógrafo (PerkinElmer® Claurus 500, EUA) equipado con un detector de conductividad térmica y una

NaCl (Sigma-Aldrich), 2.45 g  $MgSO_4$  (Sigma) and 1.6 g  $CaCl-2H_2O$  (Sigma) per 1000 mL of distilled  $H_2O$ ), 5 mL  $Na_2CO_3$  (Merck) in 8 % solution [8 g  $Na_2CO_3$  (Merck) in 100 mL distilled  $H_2O$ ], 2 mL solution of cysteine sulfite [2.5 g L-cysteine (Sigma) dissolved in 15 mL NaOH (2N) and 2.5 g  $Na_2S-9H_2O$  (Meyer) in 100 mL distilled  $H_2O$ ], 0.1 mL resazurin at 0.1 % [p/v; 0.1 g resazurin (Sigma-Aldrich) in 100 mL distilled  $H_2O$ ], 0.2 g soy peptone and 0.10 g yeast extract (Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta, 2016; Ley-de Coss *et al.*, 2016).

### Traps for capture of biogas

The trap vials were prepared by placing a saturated saline solution [350 g NaCl (common salt) in 1 L distilled  $H_2O$  and 5 mL methyl orange (Meyer) at 0.1 % in serological vials (120 mL). The pH of the saturated saline solution was adjusted with a potentiometer (Thermo Scientific® Orion 720A) to pH 2 with HCl (2N). The traps were maintained at room temperature until ready for use.

### Biodigestors

From each treatment, 0.5 g of sample were placed in serological vials (120 mL) and sterilized for 15 min at 121 °C and 15 psi. Then, 45 mL of sterile culture medium were added to each vial according to the method of Cobos and Yokoyama (1995), under a flow of  $CO_2$ , to verify sterility. The biodigestors were inoculated with 5 mL of fresh ruminal liquid (filtered with three layers of gauze and centrifuged for 3 min at 1257 xg) and were incubated 72 h at 39 °C.

The biodigestors were connected to a trap vial with a Taygon® hose (2.38 mm inside Ø and 45 cm length) with hypodermic needles (20 G x 32 mm) at the ends. A needle (20 G x 32 mm) was placed obliquely in the trap vial as escape valve and was placed inverted over a modified test tube of 50 mL.

### Biogas production

Biogas production was measured as the displacement of the saturated saline solution at 24, 48 and 72 h of incubation. The proportion of  $CH_4$  and  $CO_2$  was determined of the biogas produced at 72 h contained in the trap vial by gas chromatography. This was performed in a chromatograph (PerkinElmer® Claurus 500, USA) equipped with a thermal conductivity detector and a Porapak® packed column. The conditions of analysis were as follows: temperature of oven, detector and column of 80, 130 and 170 °C; helium as carrier gas ( $22.3 \text{ mL min}^{-1}$ ) and injection volume of 300 mL. Retention times were 0.73 and 1.05 min for  $CH_4$  and  $CO_2$ . The molar concentration of  $CH_4$  and  $CO_2$  was

columna empacada Porapak®. Las condiciones de análisis fueron: temperatura de horno, detector y columna de 80, 130 y 170 °C; helio como gas acarreador (22.3 mL min<sup>-1</sup>) y volumen de inyección de 300 µL. Los tiempos de retención fueron 0.73 y 1.05 min para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. La concentración molar de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se estimó sustituyendo los mL de gas producidos en la ecuación general de gases ideales (Posadas y Noguera, 2005).

### Características fermentativas

La degradación *in vitro* de la MS (DEGMS) a las 72 h de incubación se obtuvo al filtrar el contenido de los biodigestores en bolsas ANKOM® (F57). Las bolsas con la materia no degradada se secaron 48 h a 60 °C en una estufa (RIOSSA® HCF-41, México). La DEGMS se calculó por diferencia de peso. Las bolsas ANKOM® se sellaron por calor y se colocaron en un analizador de fibras con base en el método de Van Soest *et al.* (1991) para estimar FDN y FDA. El porcentaje de degradación de la FDN (DEGFDN) se calculó con la fórmula  $DEGFDN = (FDN\ inicial - FDN\ residual / FDN\ inicial) * (100)$ . En la degradación de FDA (DEGFDA) se usó una fórmula similar a la de DEGFDN (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

El conteo total de bacterias se obtuvo al colocar 1 mL de la parte líquida del biodigestor con 72 h de incubación en tubos de ensayo (Pyrex®) 13x150 mm con 0.25 mL de formaldehído (Sigma Aldrich) al 10 %. Este se realizó con la técnica de conteo directo en una cámara Petroff-Hausser® (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, EUA) y un microscopio (Olympus® EX51, EUA), a una magnificación de 1000X. El conteo total de bacterias se calculó con la ecuación:  $\text{conteo total de bacterias} = (\text{promedio}) (\text{factor de dilución}; 2 \times 10^7)$  (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016; Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta, 2016).

Una alícuota de 1 mL de la parte líquida del biodigestor se tomó a las 72 h de incubación y se colocó en tubos para microcentrífuga (Eppendorf) con 0.25 mL de ácido metafosfórico (Meyer) al 25 % (relación 4:1). Los tubos se centrifugaron a 20,817 xg en una centrífuga (Iletich zentrifuguen® EBA-21, Alemania) y el sobrenadante se transfirió a viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer®, EUA). El análisis de ácidos grasos volátiles (AGV) se realizó en un cromatógrafo (PerkinElmer® Claurus 500, EUA) equipado con un detector de ionización de flama (FID). Las condiciones de análisis fueron: 1 µL de volumen de inyección; columna 15 m de longitud x 0.32 mm de diámetro interno, espesor de la película de 0.25 µm, límites de temperatura de 40 a 250 °C (Elite FFAP PerkinElmer®, EUA); temperatura de 80, 250 y 140 °C en horno, inyector y columna; nitrógeno como gas acarreador (flujo 8 mL min<sup>-1</sup>); H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min<sup>-1</sup>). Los tiempos de retención fueron 1.26, 1.50 y 2.09 min para acetato, propionato y butirato (Cobos *et al.*, 2011).

estimated by substituting the mL of gas produced in the general equation of ideal gases (Posadas and Noguera, 2005).

### Fermentative characteristics

The *in vitro* degradation of DM (DEGDM) at 72 h of incubation was obtained by filtering the content of the biodigestors in ANKOM® (F57) bags. The bags with the non-degraded matter were dried 48 h at 60 °C in an oven (RIOSSA® HCF-41, Mexico). The DEGDM was calculated by difference of weight. The ANKOM® bags were sealed with heat and placed in a fiber analyzer based on the method of Van Soest *et al.* (1991) to estimate NDF and ADF. The percentage of degradation of the NDF (DEGNDF) was calculated with the formula  $DEGNDF = (\text{initial NDF} - \text{residual NDF} / \text{initial NDF}) * (100)$ . In the degradation of ADF (DEGADF) a similar formula was used to that of DEGNDF (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

The total count of bacteria was obtained by placing 1 mL of the liquid part of the biodigestor with 72 h of incubation in test tubes (Pyrex®) 13 x 150 mm with 0.25 mL of formaldehyde (Sigma Aldrich) at 10 %. This was done with the direct count technique in a Petroff-Hausser® camera (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA) and a microscope (Olympus® EX51, USA), at a magnification of 1000X. The total bacteria count was calculated with the following equation:  $\text{total bacteria count} = (\text{average}) (\text{dilution factor}; 2 \times 10^7)$  (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016; Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta, 2016).

An aliquot of 1 mL of the liquid part of the biodigestor was taken at 72 h of incubation and was placed in tubes for microcentrifuge (Eppendorf) with 0.25 mL of metaphosphoric acid (Meyer) at 25 % (ratio 4:1). The tubes were centrifuged at 20,817 xg in a centrifuge (Iletich zentrifuguen® EBA-21, Germany) and the supernatant was transferred to vials for chromatography (1.5 mL, Perkin Elmer®, USA). The analysis of volatile fatty acids (VFA) was performed in a chromatograph (PerkinElmer® Claurus 500, USA) equipped with a flame ionization detector (FID). The conditions of analysis were as follows: 1 µL of injection volume; column 15 m length x 0.32 mm inside diameter, film thickness of 0.25 µm, temperature limits of 40 to 250 °C (Elite FFAP PerkinElmer®, USA); temperature of 80, 250 AND 140 °C in oven, injector and column; nitrogen as carrier gas (flow 8 mL min<sup>-1</sup>); H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> as gases for generating flame (flow 45 and 450 mL min<sup>-1</sup>). Retention times were 1.26, 1.50 and 2.09 min for acetate, propionate and butyrate (Cobos *et al.*, 2011).

### Statistical analysis

The experimental design was completely randomized (eight independent replications). The data were analyzed with the GLM

### Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar (ocho repeticiones independientes). Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS® (2011). Los valores medios se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) y se analizaron mediante polinomios ortogonales para efecto lineal y cuadrático.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  (Cuadro 2) no presentaron diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Mao *et al.* (2010) mencionaron que la producción de metano entérico en dietas que incluyen semilla de girasol aumenta rápidamente después de la alimentación y disminuye lentamente hasta la siguiente alimentación. Lo anterior justifica los resultados de nuestro estudio porque se midió el  $\text{CH}_4$  a las 72 h de incubación, lo que ocasionó una cuantificación baja de  $\text{CH}_4$  y sin diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Además, la síntesis de acetato y butirato en el rumen incrementa la producción de  $\text{H}_2$  y, como consecuencia, las arqueas metanogénicas aumentan la producción de  $\text{CH}_4$  al utilizar el  $\text{H}_2$  y el  $\text{CO}_2$  como fuente de energía (Widiawati y Thalib, 2007; Kim *et al.*, 2012; Chuntakort *et al.*, 2014).

La DEGMS a las 72 h de incubación (Cuadro 3) presentó diferencias entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). T2, T3 y T4 disminuyeron ( $p \leq 0.05$ ) 3, 5.4 y 8 % la DEGMS respecto a T1 por el efecto lineal entre tratamientos (Cuadro 3), lo que pudo estar relacionado directamente con el contenido de fibra de la semilla y su contenido de grasa. Estos resultados son similares a los de Beauchemin *et al.* (2009), quienes reportaron una disminución en la digestibilidad de la MS y materia orgánica de 8 a 20 % al usar semillas de colza (9 %) y girasol (10 %) trituradas o grasa protegida con sales de calcio en dietas para vacas.

La DEGFDM disminuyó entre 8 y 19 % ( $p \leq 0.05$ ) al aumentar el contenido de semilla de girasol en los tratamientos (Cuadro 3). Lo anterior se puede deber a los cambios en el contenido de grasa de los tratamientos, la cual se relaciona con una reducción de protozoarios y concentración de bacterias en el rumen (Yang *et al.*, 2009). Cabe destacar que las bacterias fibrolíticas son sensibles al contenido de grasa en la dieta (Patra y Yu, 2012).

El aumento de la proporción de semilla de girasol en los tratamientos redujo ( $p \leq 0.05$ ; Cuadro 3) la

**Cuadro 2. Producción de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  *in vitro* ( $\text{mM g}^{-1}$ ) a las 72 h en dietas integrales para corderos que incluye cuatro niveles de semilla de girasol.**

**Table 2. Production of  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  *in vitro* ( $\text{mM g}^{-1}$ ) at 72 h in integral diets for lambs that includes four levels of sunflower seed.**

Tratamiento	$\text{CH}_4$	$\text{CO}_2$
T1	0.82	7.32
T2	0.94	7.65
T3	0.78	6.87
T4	0.70	6.96
EEM	0.06	0.39
Lineal	0.07	0.30
Cuadrático	0.12	0.76

a,b,c,d, Valores promedio con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Average values with different letter in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ). T1= 0 % de semilla de girasol; T2= 6 % de semilla de girasol; T3= 12 % de semilla de girasol y T4= 18 % de semilla de girasol. EEM: Error estándar de la media;  $\text{CH}_4$ : metano;  $\text{CO}_2$ : dióxido de carbono ♦ T1 = 0 % of sunflower seed; T2 = 6 % sunflower seed; T3 = 12 % sunflower seed and T4 = 18 % sunflower seed. SEM: Standard error of the mean;  $\text{CH}_4$ : methane;  $\text{CO}_2$ : carbon dioxide.

procedure of SAS® (2011). The mean values were compared with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) and were analyzed using orthogonal polynomials for linear and quadratic effect.

## RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  (Table 2) did not present differences among treatments ( $p > 0.05$ ). Mao *et al.* (2010) mentioned that the production of enteric methane in diets that include sunflower seed increases rapidly after feeding and slowly decreases until the next feeding. The above justifies the results of our study because the  $\text{CH}_4$  was measured at 72 h of incubation, which caused a low quantification of  $\text{CH}_4$  and without differences among treatments ( $p > 0.05$ ). Furthermore, the synthesis of acetate and butyrate in the rumen increases the production of  $\text{H}_2$ , and consequently the methanogenic arcs increase the production of  $\text{CH}_4$  by utilizing the  $\text{H}_2$  and the  $\text{CO}_2$  as energy source (Widiawati and Thalib, 2007; Kim *et al.*, 2012; Chuntakort *et al.*, 2014).

The DEGDM at 72 h of incubation (Table 3) presented differences among treatments ( $p \leq 0.05$ ). T2, T3 and T4 decreased ( $p \leq 0.05$ ) the DEGDM

**Cuadro 3. Características fermentativas en dietas integrales para corderos que incluye cuatro niveles de semilla de girasol a 72 h de incubación.**  
**Table 3. Fermentative characteristics in integral diets for lambs that include four levels of sunflower seeds at 72 h of incubation.**

Tratamiento	DEGMS, %	DEGFND, %	DEGFDA, %	[Bacterias]
T1	88.80a	79.24a	69.70a	7.5 x 10 <sup>9</sup>
T2	86.18b	73.07b	62.44b	6.8 x 10 <sup>9</sup>
T3	84.01c	68.45c	57.13c	6.5 x 10 <sup>9</sup>
T4	81.86d	63.96d	53.67d	7.0 x 10 <sup>9</sup>
EEM	0.31	0.56	0.80	0.27
Lineal	0.01	0.01	0.01	0.50
Cuadrático	0.46	0.15	0.29	0.36

a,b,c,d Valores promedio con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ♦ *verage values with different letter in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).*

T1= 0 % de semilla de girasol; T2= 6 % de semilla de girasol; T3= 12 % de semilla de girasol y T4= 18 % de semilla de girasol. EEM = Error estándar de la media; DEGMS = Degradación de la materia seca; DEGFND; Degradación de la fibra detergente neutro; DEGFDA= Degradación de la fibra detergente ácida. [Bacterias]= Concentración de bacterias totales mL<sup>-1</sup> ♦ T1 = 0 % sunflower seed; T2 = 6 % sunflower seed; T3 = 12 % sunflower seed and T4 = 18 % sunflower seed. SEM = Standard error of the mean; DEGDM = Degradation of dry matter; DEGNDF = Degradation of neutral detergent fiber; DEGADF = Degradation of acid detergent fiber. [Bacteria] = Concentration of total bacteria mL<sup>-1</sup>.

DEGFND de 8 a 19 % y la DEGFDA 10 a 33 %, lo cual es similar a la reducción de la degradabilidad de la MS (8.9 a 19.2 %), FDN (10.1 a 19.8 %) y FDA (3.7 a 28.8 %) al incluir en la dieta pulpa de coco, semillas de algodón y semillas de girasol (Chuntrakort *et al.*, 2014). La adición de 10 % de semillas de oleaginosas (linaza, canola y girasol) en una dieta basal con pasto ovinillo (*Dactylis glomerata L.*) no afectó la digestibilidad de la MS y FDN (Soder *et al.*, 2013).

La cantidad de bacterias totales a las 72 h de incubación no mostró diferencias entre tratamientos ( $p > 0.05$ ; Cuadro 3). Esto es similar al reportado por Ley de Coss *et al.* (2013), pero inferior a lo publicado por Dehority (2003). Los primeros publicaron un conteo de 10<sup>9</sup> bacterias mL<sup>-1</sup>; mientras los segundos de 10<sup>10</sup> a 10<sup>12</sup> bacterias mL<sup>-1</sup> en rumen. Los resultados de nuestro estudio se relacionan con principios ecológicos, ya que la población microbiana del rumen está integrada por una variedad de especies que constantemente cambia con base en el medio que lo rodea. Así, la eliminación o supresión de algún grupo microbiano causa la adaptación de otro grupo para llenar su hueco en el ecosistema ruminal (Hungate, 1966; Czerkawski, 1986; Weimer, 1998).

La concentración de AGV total mostró una disminución lineal ( $p \leq 0.05$ ) respecto al testigo (T1);

by 3, 5.4 and 8 % with respect to T1 by the linear effect among treatments (Table 3), which could be directly related to the fiber content of the seed and its fat content. These results are similar to those of Beauchemin *et al.* (2009), who reported a reduction in the digestibility of the DM and organic matter of 8 to 20 % by using ground rapeseed (9 %) and sunflower seed (10 %) or fat protected with calcium salts in diets for cows.

The DEGNDF decreased between 8 and 19 % ( $p \leq 0.05$ ) when increasing the sunflower seed content in the treatments (Table 3). The above may be due to the changes in the fat content of the treatments, which is related to a reduction of protozoa and bacteria concentration in the rumen (Yang *et al.*, 2009). It should be pointed out that the fibrolytic bacteria are sensitive to the fat content in the diet (Patra and Yu, 2012).

The increase in the proportion of sunflower seed in the treatments reduced ( $p \leq 0.05$ ; Table 3) the DEGNDF by 8 to 19 % and the DEGADF by 10 to 33 %, which is similar to the reduction of degradability of the DM (8.9 to 19.2 %), NDF (10.1 to 19.8 %) and ADF (3.7 to 28.8 %) by including in the diet coconut pulp, cottonseeds and sunflower seeds (Chuntrakort *et al.*, 2014). The addition of 10 %

Cuadro 4). La concentración de acético, propiónico y butírico mostró un comportamiento similar al de AGV total, lo cual puede estar relacionado con la disminución en la DEGMS. La disminución en la concentración de AGV en el rumen se relacionó con una menor concentración de  $H_2$  (Dohome *et al.*, 1999), debido a que es el principal subproducto después de la síntesis de ácido acético y ácido butírico en el rumen. Además, el  $H_2$  generado y la presencia de arqueas metanogénicas incrementan la producción de  $CH_4$  al utilizar el  $H_2$  y  $CO_2$  como fuente de energía (Kim *et al.*, 2012). Los tratamientos presentaron un efecto lineal ( $p \leq 0.05$ ) en la disminución de AGV conforme aumentó el contenido de semilla de girasol. Esto es congruente con lo reportado por Jordan *et al.* (2006), quienes mencionaron que la concentración total de AGV disminuyó al utilizar aceite de coco en dietas para ganado de carne, porque se redujo la digestibilidad de la MS y de los componentes de la FDN y FDA.

## CONCLUSIONES

La adición de hasta 18 % de semilla de girasol en dietas para ovinos no afecta la producción de gases de efecto invernadero. El incremento de la semilla de girasol disminuye la degradación de los nutrientes de la dieta y la fermentación de los ácidos grasos volátiles.

of oilseeds (linseed, canola and sunflower) in a basal diet with orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) did not affect the digestibility of the DM and NDF (Soder *et al.*, 2013).

The amounts of total bacteria at 72 h of incubation did not show differences among treatments ( $p > 0.05$ ); Table 3). This result is similar to that reported by Ley de Coss *et al.* (2013), but lower than that published by Dehority (2003). The former published a count of  $10^9$  bacteria  $mL^{-1}$ ; whereas the latter reported from  $10^{10}$  to  $10^{12}$  bacteria  $mL^{-1}$  in rumen. The results of our study are related to ecological principles, given that the microbial population of the rumen is integrated by a variety of species that constantly change based on the medium that surrounds it. Therefore, the elimination or suppression of any microbial group causes the adaptation of another group to fill its space in the ruminal ecosystem (Hungate, 1966; Czerkawski, 1986; Weimer, 1998).

The concentration of total VFA showed a linear decrease ( $p \leq 0.05$ ) with respect to the control (T1; Table 4). The concentration of acetic, propionic and butyric showed a behavior similar to that of total VFA, which may be related to the decrease in the DEGDM. The decrease in the concentration of VFA in the rumen was related to a lower concentration of  $H_2$  (Dohome *et al.*, 1999), because it is the principal byproduct after the synthesis of acetic acid

**Cuadro 4. Concentración de ácidos grasos volátiles (mM) a las 72 h en dietas integrales para corderos que incluye cuatro niveles de semilla de girasol.**

**Table 4. Concentration of volatile fatty acids (mM) at 72 h in integral diets for lambs that include four levels of sunflower seed.**

Tratamiento	Acético	Propiónico	Butírico	A:P	AGV total
T1	73.93a	66.05a	14.80a	1.12	154.78a
T2	72.72a	63.34ab	14.41a	1.15	150.47ab
T3	69.64ab	62.03b	14.00ab	1.12	145.62bc
T4	65.85b	59.70b	13.31b	1.10	138.86c
EEM	1.17	0.91	0.26	0.17	2.01
Lineal	0.01	0.01	0.01	0.34	0.01
Cuadrático	0.29	0.84	0.63	0.16	0.55

a,b,c,d Valores promedio con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Average values with different letter in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ). T1= 0 % de semilla de girasol; T2= 6 % de semilla de girasol; T3= 12 % de semilla de girasol y T4= 18 % de semilla de girasol. EEM: Error Estándar de la Media; A:P relación acético propiónico; AGV: ácidos grasos volátiles ♦ T1 = 0 % sunflower seed; T2 = 6% sunflower seed; T3 = 12 % sunflower seed and T4 = 18 % sunflower seed. SEM: Standard Error of the Mean; A:P ratio acetic propionic; VFA: volatile fatty acids.



## LITERATURA CITADA

- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005. 18th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Official Method.
- Beauchemin, K. A., M. McGinn, S. Benchaar, C., and L. Holtshausen. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 92: 2118–2127.
- Chuntrakort, P., M. Otsuka, K. Hayashi, A. Takenaka, S. Udchachon, and K. Sommart. 2014. The effect of dietary coconut kernels, whole cottonseeds and sunflower seeds on the intake, digestibility and enteric methane emissions of Zebu beef cattle fed rice straw based diets. *Liv. Sci.* 161: 80-89.
- Chuntrakort, P., M. Otsuka, K. Hayashi, and K. Sommart., 2011. Effects of oil plant use for rumen methane mitigation in *in vitro* gas production. *Khon Kaen Agric. J.* 39: 246–250.
- Cobos, P. M. A., A. Ley de Coss, N. D. Ramírez, S. S. González, and R. Ferrera-Cerrato. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Res. Vet. Sci.* 90: 26-30.
- Cobos, P. M. A., and M. Yokoyama, T. 1995. *Clostridium parvifricum* var. ruminantium: Colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Rumen Ecology Research Planning, Wallace, R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a Workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI) Addis Ababa, Ethiopia. pp: 151-161.
- Czerkawski, J. W. 1986. An Introduction to Rumen Studies. Pergamon Press, Oxford, UK. 236 p.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Rumen Bacteria – History, Methods of *in vitro* Cultivation and Discussion of Mixed Culture Fermentation. Nottingham University Press. pp: 157-176
- Dohme, F., L. Machmüller, A., B. Estermann, P. Pfister, A. Wasserfallen, and M. Kreuzer. 1999. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 187-192.
- Eckard, R. J., C. Grainger, and M. de Klein, C.A. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Liv. Sci.* 130: 47-56.
- Hernández-Morales, J., P. Sánchez-Santillán., N. Torres-Salado., J. Herrera-Pérez., A. R. Rojas-García., I. Reyes-Vázquez., M. A. Mendoza-Núñez. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 9: 105-120.
- Hill, J. C., G. McSweeney, A. Wright, G. Bishop-Hurley, and K. Kalantar-Zedeh. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* 34: 1:26-35.
- Hungate, R. E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York, NY.
- IPCC. 2007. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Climate change 2007: the physical basis. In: Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H. L. Miller (eds). The Fourth Assessment Report, Contribution of Working Group 1 to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA. 996 p.
- and butyric acid in the rumen. Furthermore, the H<sub>2</sub> generated and the presence of methanogenic archaea increment the production of CH<sub>4</sub> by utilizing the H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> as energy source (Kim *et al.*, 2012). The treatments presented a linear effect ( $p \leq 0.05$ ) in the reduction of VFA as the sunflower seed content increased, which is congruent with that reported by Jordan *et al.* (2006), who mentioned that the total concentration of VFA decreased by utilizing coconut oil in diets for beef cattle, because the digestibility of the DM and of the components of the NDF and ADF was reduced.

## CONCLUSIONS

The addition of up to 18 % of sunflower seed in diets for sheep does not affect the production of greenhouse gases. The increment of sunflower seed reduces the degradation of the nutrients of the diet and the fermentation of the volatile fatty acids.

—End of the English version—

-----\*-----

- Jordan, E., K. Lovett, D., J. Monahan, F. Callan, B. Flynn, and P. O'Mara, F. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84: 162-170.
- Key N., and G. Tallard. 2012. Mitigating methane emissions from livestock: a global analysis of sector policies. *Climatic Change* 112: 387–414.
- Kim, M. J., S. Lee, J., Kumar, S., M. Rahman, M., S. Shin, J. and S. Ra, C. 2012. Indirect estimation of CH<sub>4</sub> from livestock feeds through TOCs evaluation. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 25: 496-501.
- Kumar, P. A. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environ. Monit. Assess.* 184: 1929-195.
- Kumar, S., K. Choudhury, D. Carro, W. Griffith, S. Dagar, M. Puniya, S. Calabro, S. R. Ravella, T. Dhewa, R. C. Upadhyay, K. Sirohi, S. Kundu, M. Wanapat, and A. K. Puniya. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 31-44.
- Kumar, S., K. Puniya, A., Puniya, M., S. Dagar, S., K. Sirohi, K. Singh, and W. Griffith. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 557-1566.
- Ley de Coss, A., C. Arce-Espino, M. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, y R. Pinto-Ruiz. 2013. Estudio comparativo entre la cepa de *Pediococcus acidilactici* aislada del rumen de borregos y un consorcio de bacteria ruminales. *Agrociencia* 47: 567-578.

- Ley-de Coss, A., W. de León-de León, C. Guerra-Medina E., C. Arce-Espino, y R. Pinto-Ruiz. 2016. Crecimiento de bacterias ruminales en un medio de cultivo a base de pasta de *Jatropha curcas L.* sin detoxificar. *Agrociencia* 50: 1001-1011.
- Mao, H., J. Wang, Y. Zhou, and J. Liu. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Liv. Sci.* 129: 56-62.
- Matthäus, B., and A. Luciana G., 2003. Anti-nutritive constituents in oilseed crops from Italy. *Ind. Crop Prod.* 21: 89-99.
- NRC (National Research Council). 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants, Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids.* Washington, D.C. USA. The National Academics Press. 362 p.
- Patra, A. K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: A synthesis of current research and future directions. *Environ. Monit. Assess.* 184: 1929-1952.
- Patra, A. K., and Z. Yu. 2012. Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 96: 1782-1792.
- Posada, S. L., and R. R. Noguera. 2005. *In vitro* gas production technique: A tool for evaluation of ruminant feeds. *Livest. Res. Rural Develop.* 17: 4.
- Sánchez-Santillán, P., M. A. Cobos-Peralta., D. Hernández-Sánchez., A. Álvaro-Iglesias., D. Espinosa-Victoria., J. G. Herrera-Haro. 2016. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia.* 50: 575-582.
- Sánchez-Santillán, P., y M. A. Cobos-Peralta. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. *Agrociencia* 50: 565-574.
- SAS. 2011. *SAS/STAT Software. Versión 9.3.* Cary, NC SAS, USA: Institute INC
- Shibata, M., and F. Terada. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Anim. Sci. J.* 81: 2-10.
- Smith, P., D. Martino, Z. Cai, D. Gwary, H. Janzen, P. Kumar, B. McCarl, S. Ogle, F. O'Mara, C. Rice, B. Scholes, and O. Sirotenko. 2007. Mitigation. Contribution III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- Soder, K.J., F. Brito, A., and D. Rubano, M. 2013. Short communication: Effect of oilseed supplementation of an herbage diet on ruminal fermentation in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 96: 2551-2556.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. de Haan. 2006. Livestock's long shadow: Environmental issues and options. *Renew. Resour. J.* 24: 15-17.
- Van Soest, P. J., B. Robertson J., and A. Lewis B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Vanegas, J. L., D. Carro, M., R. Alvir, M., and J. González. 2017. Protection of sunflower seed and sunflower meal protein with malic acid and heat: effects on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *J. Sci. Food Agric.* 97:350-356.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76:3114-3122.
- Widiawati, Y., and A. Thalib. 2007. Comparison fermentation kinetics (*in vitro*) of grass and shrub legume leaves: The pattern of VFA concentration, estimated CH<sub>4</sub> and microbial biomass production. *J. Anim. Vet. Sci.* 12: 96-104.
- Yang, S. L., D. P. Bu, J. Q. Wang, Z. Y. Hu, D. Li, H. Y. Wei, L. Y. Zhou, and J. L. Loo. 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation effect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal* 3: 1562-1569.
- Zhang, R. H., A. Mustafa, F., and X. Zhao. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127: 220-233.