



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

INFLUENCIA DE *Lactobacillus farciminis* SOBRE LA
FERMENTACIÓN EN INTESTINO GRUESO Y PRODUCCIÓN DE
GASES EN *IN VITRO* EN CABALLO

(INFLUENCE OF *Lactobacillus farciminis* ON FERMENTATION IN
LARGE INTESTINE AND PRODUCTION OF GASES ON *IN VITRO*
IN HORSE)

**ARTICULO ESPECIALIZADO PARA
PUBLICAR EN REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

VICTOR MANUEL FLORES MATIAS

ASESORES:

DR. ABDELFAHATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM
DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR

Toluca, Estado de México, Junio de 2018



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 ALIMENTACIÓN.....	8
2.2 ANATOMÍA.....	9
2.3 INGESTIÓN DE FORRAJE.....	11
2.4 PROBIÓTICOS.....	12
2.5 JUSTIFICACIÓN.....	16
2.6 HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	18
OBJETIVOS GENERALES.....	18
OBJETIVO ESPECIFICO.....	18
MATERIALES.....	19
MÉTODO.....	19
RESULTADOS.....	23
LÌMITE TIEMPO Y ESPACIO.....	38
REFERENCIAS.....	39

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mis padres, Inocencio Flores y Francisca Matias. Porque esto es de ellos, son la mayor inspiración de mi vida, la mayoría de lo logrado en mi vida es gracias a ellos, con el esfuerzo de toda mi familia lo estamos logrando paso a paso.

Gracias a su esfuerzo y sacrificios que han tenido, con obstáculos y caídas mis padres nunca han dejado caer, gracias a su cariño, consejos, palabras de aliento y paciencia que me han tenido para seguir avanzando.

También agradezco a mis hermanos Yazmin, Areli, Francisco gracias por su cariño, apoyo y consejos, por apoyarme a diario seguir adelante.

Doy gracias a mis profesores que ayudaron y me tuvieron paciencia durante toda la licenciatura, compañeros que vivimos tantas aventuras juntos, desveladas, sustos, días sin comer, gracias porque juntos descubrimos muchas cosas.

De igual forma doy las gracias a mi asesor el Dr. Salem por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, gracias a cada uno de todos los que de una u otra forma ayudaron en mi paso por la facultad.

INTRODUCCIÓN

El caballo desde sus orígenes en selvas y pantanos ha evolucionado, adaptando su morfología para alimentarse de hierbas que crecen al ras de suelo y para tener un amplio campo de visión, una huida rápida y explosiva (Munizaga, 2014).

En la actualidad el caballo se utiliza principalmente para actividades recreativas, aunque también siguen siendo una fuerza de trabajo en distintas actividades que favorecen al ser humano. Esto ha modificado a la mayoría de los caballos que realizan estas actividades a estar confinados a una caballeriza, y su alimentación se ve modificada, esto trae problemas en su digestión (Frape, 1992)

El caballo se considera como un herbívoro monogástrico no rumiante, esto indica que su proceso digestivo es fundamentalmente enzimático, además en el ciego y el colon de este animal se lleva a cabo la fermentación (Real, 2010).

Por tal motivo los caballos prefieren consumir pequeñas cantidades de alimento varias veces al día, que consumir dos veces al día grandes cantidades (Real, 2010).

El intestino grueso del caballo tiene un ciego muy amplio que sirve como una cámara de fermentación. Millones de bacterias y protozoos producen enzimas que descomponen la fibra de la planta (Roberfroid, 1995).

Existen algunos problemas digestivos que se presentan por cambios en la alimentación y que se ve alterada la fermentación en intestino grueso del equino. Existen hoy en día productos como los probióticos que ayudan mejorando la fermentación. Los probióticos son aquellos en los que existen bacterias que ayudan a reforzar el sistema inmunológico, estas bacterias, además, pueden sobrevivir a una digestión llegando vivas al colon y ayudando a restituir la microbiota intestinal (De León et al., 2001).

Bacterias y animales presentan una relación simbiótica: los animales necesitan una población bacteriana equilibrada en su tracto gastro-intestinal para mantener un estado saludable, evitar infecciones y digerir más efectivamente el alimento,

obteniendo nutrientes que de otra manera no estarían disponibles, mientras que las bacterias, por su parte, se benefician de un entorno adecuado y de un suministro continuo de sustrato para fermentar (Ortiz y Mallo, 2013)

Por tal motivo pretendemos evaluar el impacto nutritivo del uso de *Lactobacillus farciminis* como aditivo alimenticio en nutrición de caballos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Los caballos han evolucionado para la vida en pastoreo (Frape, 1992). Los pastos contienen cantidades variables de agua según el grado de madurez, mientras que los principios energéticos de la materia seca son mayoritariamente carbohidratos y cantidades menores de proteínas y lípidos (McDonald et al., 2006). Los carbohidratos son diversos (azúcares libres, fructosanos, hemicelulosas, celulosa, etc.) (Jarrige, 1981), o por su lugar de digestión en el tracto digestivo del caballo (fermentables e hidrolizables) (Hoffman, 2003). A lo largo del año, la proporción de los diferentes tipos de carbohidratos varía con el estado vegetativo: inicialmente predominan los carbohidratos de reserva, pero los carbohidratos parietales van adquiriendo una mayor relevancia al avanzar el ciclo porque las plantas necesitan más cantidad de tejidos fibrosos para mantener la estructura (McDonald et al., 2006). Una característica común de los forrajes de gramíneas y leguminosas es el bajo o nulo contenido de almidón (Jarridge, 1981).

En libertad, los caballos pasan pastando de 12 a 16 horas diarias en períodos de 2 a 3 horas alternados con momentos de descanso e interacción social, en México y en muchas partes del mundo el caballo ya no cumple con esta condición (Ralston, 1984).

En la parte anterior del aparato digestivo, el proceso digestivo del caballo es similar al de los restantes monogástricos: la digestión enzimática del alimento libera glucosa, aminoácidos y ácidos grasos para su absorción; pero además, el elevado desarrollo del intestino grueso le permite obtener energía suplementaria en forma de ácidos grasos volátiles mediante la fermentación microbiana de la fibra y de la fracción del alimento no digerida enzimáticamente, de forma análoga a los rumiantes (Harris, 2007). En el intestino grueso también se absorben aminoácidos microbianos, aunque de forma muy limitada (Jarridge y Tisserand, 1984).

El almidón y proteínas son algunos de los nutrientes con mayor importancia a las necesidades de energía del caballo, y también los nutrientes con la más alta posibilidad de causar efectos desfavorables al caballo cuando se alimenta en

exceso (NRC, 2007). Maximizar la digestión del almidón en el intestino delgado del caballo es importante para evitar la fermentación del almidón en el intestino grueso y enfermedades relacionadas incluyendo la acidosis y laminitis (Garner et al., 1977).

El intestino grueso constituye aproximadamente el 60 % del total de la capacidad del tracto gastrointestinal, y es un buen sitio para que se realice la degradación bacteriana de los alimentos. Este órgano abarca tres porciones: el ciego, colon replegado y el colon flotante o colon menor, que desembocan en el recto (Real, 2010).

La fermentación se lleva a cabo en el intestino grueso. El ciego representa alrededor del 25-30% del intestino grueso. El intestino grueso del caballo está diseñado para utilizar la fibra de las plantas. Los carbohidratos insolubles, tales como la celulosa y la hemicelulosa de los forrajes, así como el almidón y otros hidratos de carbono solubles que no fueron digeridos en el intestino delgado, desembocan en el intestino grueso. Cuando el alimento sale del intestino delgado entra primero en el ciego. Después de la fermentación, el alimento entra en el colon para la digestión y absorción. La fermentación microbiana en el intestino grueso da lugar a la producción de ácidos grasos volátiles que son una fuente importante de nutrientes para el caballo. El intestino grueso también sirve como un reservorio de agua y electrolitos que son vitales para mantener el rendimiento durante el ejercicio (Marcus Clauss, 2013).

No obstante, precisamente las particularidades anatómo-fisiológicas del intestino predisponen a los caballos al padecimiento de trastornos digestivos y metabólicos más o menos graves, sobre todo cuando es imposible basar la alimentación en el pastoreo, el consumo de forraje es limitado y/o cuando una elevada demanda nutricional hace necesaria la utilización de abundantes alimentos concentrados (Harris, 2007).

La población de la microbiota está construida por bacterias y protozoos, que cambian en su calidad y cantidad en la alimentación que recibe el caballo, la

degradación de celulosa con producción de ácidos grasos volátiles los hidratos de carbono, ácido láctico, síntesis bacteriana y proteína de alto valor biológico a partir del amoníaco obtenido de la degradación proteica y la síntesis de vitaminas y complejo b (Costa, 1993). El intestino grueso presenta un ecosistema microbiano similar al del rumen, los menores coeficientes de digestibilidad de la celulosa un 15% en promedio que se observan en caballos en relación a los bovinos, determinan que la digestibilidad de los alimentos se encuentre más afectada por su contenido en fibra en el equino que en el bovino (González, 2007). Sin embargo, el caballo es capaz de compensar esta disminución de la digestibilidad aumentando el consumo del alimento.

2.1 ALIMENTACIÓN

Los caballos se clasifican como herbívoros. Son animales de pastoreo con sistemas digestivos diseñados para el consumo constante de alimentos de origen vegetal. A diferencia de la mayoría de los otros herbívoros, el sistema digestivo del caballo es considerado monogástrico en lugar de los rumiantes. Para digerir los forrajes disponen de un ciego y un colon relativamente grandes que actúan como cámara de fermentación bacteriana. Esta es una particularidad que hace que de una dieta normal el caballo obtenga la mayor energía de intestino grueso. Los órganos digestivos incluyen el estómago, intestino delgado e intestino grueso. El estómago y el intestino delgado, y es donde la mayoría de las proteínas, grasas, vitaminas y minerales contenidos en la alimentación se digieren y se absorben. Aunque el caballo presenta un aparato diferente al de un rumiante, las características únicas de su intestino grueso permiten que el caballo utilice la celulosa y otros sustratos fermentables de la misma forma que los rumiantes. El intestino grueso del caballo tiene un ciego muy amplio que sirve como una cámara de fermentación. Miles de millones de bacterias y protozoos producen enzimas que descomponen la fibra de la planta. En el caballo, este proceso de fermentación se produce por detrás de la zona donde la mayoría de los nutrientes

son absorbidos, y como resultado, los caballos no obtienen todos los nutrientes sintetizados por microorganismos en su intestino grueso (Marcus, 2013).

2.2 ANATOMÍA

El caballo es un animal monogástrico, en donde la mayor parte de la comida es degradada en el ciego y el colon (Cunha, 1991).

El tracto gastrointestinal se caracteriza por un simple estómago y el intestino posterior una cámara de fermentación voluminosa, el ciego y colon proximal (Marcus, 2013).

Estomago: En el caballo, el estómago es relativamente pequeño y se encuentra situado mayormente a la izquierda del plano medio, la capacidad es de 8 a 15 lts.

Intestino Delgado

El intestino delgado tiene aproximadamente el 30% del peso total del tracto digestivo del caballo, y es donde la mayoría de los nutrientes del alimento se digieren y se absorben.

Intestino Grueso:

Es fundamental conocer la anatomía de las vísceras que lo conforman que son asiento de patologías que pueden derivar en síndrome abdominal agudo.

Ciego:

Longitud: 1,25 mts.

Capacidad: 25- 30 l.

Se sitúa en la fosa del ijar derecho. Se proyecta desde la región iliaca y sublumber hacia el suelo del abdomen, por detrás del cartílago xifoides.

El cuerpo está unido dorsolateralmente a la primera porción del colon por el pliegue cecocólico.

Colon Mayor

Por los cambios que ha presentado la forma de alimentar a los equinos puede presentar diferentes patologías a saber: vólvulos, torsión, impactación, etc., las cuales llevan a producir un síndrome de abdomen agudo. Todas estas patologías pueden ser perfectamente diferenciables por palpación rectal. El colon mayor ascendente va desde el orificio cecocólico hasta el colon transverso (White N.A. 2006).

Longitud: 3 a 4 m

Diámetro: 25 cm

El colon mayor empieza en el orificio cecocolico y termina juntándose con el colon menor detrás del saco ciego del estómago.

La primera parte colon ventral derecho llega hasta el cartílago xifoides produciendo la flexura esternal, gira hacia la izquierda formando la porción ventral izquierda, llegando por ventral hasta el techo de la pelvis, se repliega sobre sí mismo, formando la flexura pelviana, continuado con la porción dorsal izquierda , llegando hasta el diafragma, flexura diafragmática, continuando con el colon dorsal derecho primera porción, produciendo una constricción continuando con el colon menor a la altura del riñón izquierdo. Las porciones ventrales tienen cuatro tenías, la flexura pelviana tiene una sola cinta, el colon dorsal izquierdo tiene una cinta continuación de la precedente y luego dos más, continuándose con la porción dorsal derecha 3 tenias.

Colon menor y recto:

Con respecto al colon menor, por ser estrecho, laxo y largo (longitud: 3.5 m, diámetro: 7.5 a 10 cm) evita la salida de enterolitos (Dyce, 2012).

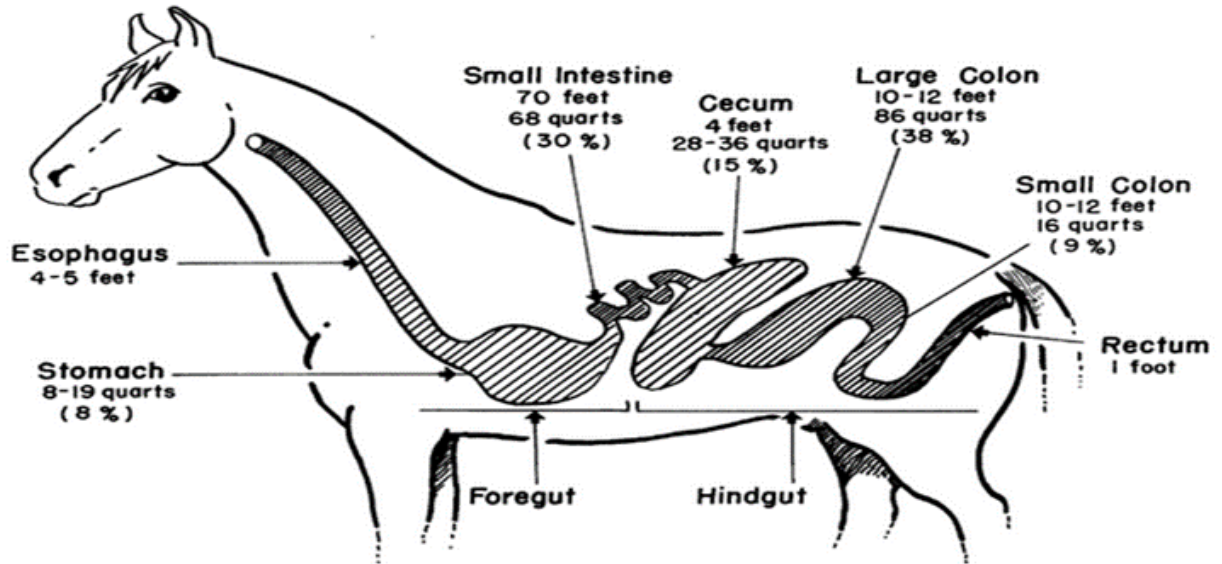


Fig.1 modificado de (Cunha, 1991).

2.3 INGESTIÓN DE FORRAJE

Dada las características anatómicas que presenta el aparato digestivo del equino este debe de consumir un porcentaje igual o mayor de forraje en comparación con los concentrados, este va en relación con la función zootécnica, estado fisiológico, edad, sexo, raza, etc. (McDonald et al., 2006)

Son llamados forrajes, aquellos alimentos que tienen más de 18 % de fibra bruta en su composición. (McDonald et al., 2006.)

El aumento de la fibrosidad del forraje se asocia con una reducción de su consumo (Boulot, 1987, citado por Edouard, 2007).

Para garantizar la seguridad digestiva de las raciones, el consumo mínimo de forraje debe ser de 1 kg/100 kg PV/d, y en ningún caso puede ser inferior a 0,5 kg/100 kg PV/d (INRA, 1990; Coenen, 2001).

Dentro de los forrajes más consumidos por los equinos encontramos:

Pasturas Implantadas: son una mezcla de gramíneas y leguminosas. Las gramíneas más utilizadas son: avena, cebadilla, ray grass perenne, pasto ovillo y festuca. Las leguminosas más utilizadas son: alfalfa, tréboles y lotus. Normalmente, se usan no más de 4 especies para hacer una pastura (Coenen, 2001).

Verdes: de verano (el único usado es el maíz) y de invierno (ray grass anual, avena, cebada, triticale, etc).

Henos: Es la pastura sometida a un proceso de deshidratación. El objeto de la henificación es reducir el contenido de agua en los forrajes verdes para poder almacenarlos el tiempo que sea necesario sin que se fermenten.

La calidad del heno depende de las especies que lo componen, de su procedencia por suelo y clima, del momento en que fue cosechado, de la conservación, de la antigüedad, de que contenga o no malezas, y de los contaminantes (hongos, bacterias e insectos).

Granos (cereales).

Los cereales, excelente fuente de energía para el caballo en el trabajo. Son ricos en energía fácilmente disponible, almacenada en forma de almidón. Avena, maíz, cebada, triticale, trigo (Martin, 2001).

2.4 PROBIÓTICOS

Los alimentos probióticos son aquellos en los que existen bacterias que ayudan a reforzar el sistema inmunológico, estas bacterias, además, pueden sobrevivir a una digestión llegando vivas al colon y ayudando a restituir la microbiota intestinal que pueda haber sido alterada por alguna causa (De León 2001).

Según la FDA de los Estados Unidos, el término probiótico se refiere a aquellos suplementos que se añadan a las dietas de los animales, compuestos por células vivas o sus medios de cultivos, los cuales deben necesariamente provocar los efectos positivos en el balance microbiano intestinal (De León. 2001).

El uso de aditivos que pueden aportar beneficios nutricionales a los animales. Ha aumentado mucho en los últimos años, con el objetivo de mejorar la calidad de la dieta, estimular el desempeño animal y aumentar la ganancia económico-financiera de la explotación ganadera. En la industria equina destacan el uso de probióticos para ayudar a la digestión y salud de los equinos.

Los probióticos son microorganismos vivos añadidos a la dieta para mejorar el medio intestinal, especialmente el equilibrio de la microbiota (Fuller, 1989). La microbiota intestinal ejerce un papel de extrema importancia en la salud del hospedador al inducir cambios morfo-fisiológicos en el epitelio intestinal y el sistema inmunológico local. Participa, además, del sistema de defensa no inmunológico compitiendo con los microbios oportunistas por el aprovechamiento de los nutrientes y el espacio, y elaborando sustancias antimicrobianas, enzimas y vitaminas (Vanbelle et al., 1990).

2.4.1 *Lactobacilos*

Los lactobacilos pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*, está constituida por 116 especies, morfológicamente estas bacterias son Gram-positivas y presentan una forma de bastón, aunque también pueden encontrarse en forma de cocobacilos, bastones curvados o coriniformes, pueden presentarse en cadenas o de manera simple, su tamaño varía de 0,5 a 1,2 μm de ancho por 1,0 a 10,0 μm de largo.

Por la temperatura en la que se desarrollan, pueden ser mesófilos o termófilos, pudiendo variar en el rango de 10 a 45° C.

De acuerdo a los productos de su fermentación se pueden clasificar en *homofermentativas* estrictas, *heterofermentativas* estrictas y *heterofermentativas facultativas*.

Tomando en cuenta estas descripciones, se clasifican como *homolácticas* y *heterolácticas*; las bacterias *homolácticas* solo tendrán como resultado la fermentación ácido láctico, mientras las *heterofermentativas* aportan además del ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (Hurst, 1981 citado por

Samaniego y Sosa del Castillo 2000; Prescott et al., 2004; Olivera, 2011; Angelis y Gobbetti, 2011; Björkrothand y Koort, 2011).

Los *lactobacilos* tienen requerimientos nutricionales complejos; son anaerobios que se encuentran en ambientes que contienen sustratos ricos en carbohidratos tales como la membrana mucosa intestinal.

Los *lactobacilos* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan, o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras. Los *lactobacilos* crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 dependiendo de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C (Samaniego y Sosa del Castillo, 2000).

2.4.2. *Lactobacillus farciminis*

Se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos. Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas, no son motiles, son gram-positivos y no esporulan. Esta bacteria fue descrita por primera vez en 1983, es una bacteria *homofermentativa* obligada, lo que significa que el producto de su fermentación es ácido láctico solamente (Reuter, 1983).

Numerosas patologías del tubo digestivo, y en particular del intestino, implican en mayor o menor grado fenómenos inflamatorios. El uso de bacterias lácticas de la especie *Lactobacillus farciminis* para el tratamiento o prevención de una patología del tubo digestivo, especialmente una patología inflamatoria aguda o crónica del intestino. Se ha observado que la actividad antiinflamatoria de *Lactobacillus farciminis* se debió a la producción in situ en el lumen digestivo de óxido nítrico (NO) por esta bacteria. La producción de óxido nítrico en cultivo por *Lactobacillus farciminis* ha sido descrita por (Watkins et al., 1990). Un posible papel del óxido

nítrico en la regulación de las funciones digestivas y / o la protección de la mucosa digestiva ha sido sugerido por varias observaciones. Se sabe que algunas células del epitelio intestinal pueden producir óxido nítrico después de la inducción por ciertas citoquinas pro inflamatorias y / o por las toxinas lipopolisacáridas (LPS) de bacterias entero invasoras. Se cree que este óxido nítrico endógeno participa, a través de sus propiedades antimicrobianas, en la defensa contra microorganismos patógenos. También se piensa que participa, cuando se produce en bajas cantidades, en la protección de la mucosa intestinal. Sin embargo, en mayores cantidades, se cree que contribuye a la aparición y mantenimiento de un estado inflamatorio crónico (Fioramonti et al., 2000).

2.5 JUSTIFICACIÓN

La nutrición de los caballos es uno de los puntos más importantes en la salud y bienestar de estos, por las complicaciones digestivas que se suscitan en el intestino grueso del animal si existe un desequilibrio de sus nutrientes.

Los caballos han sido confinados a una caballeriza y modificado su alimentación esto altera su fermentación y producción de gases.

La adición de la bacteria *Lactobacillus farciminis* en nutrición de caballos puede ayudar a disminuir problemas digestivos de intestino grueso, mejorando la fermentación y la salud.

2.6 HIPÓTESIS

El uso de la *bacteria ácido láctico Lactobacillus farciminis* tiene impacto positivo sobre la nutrición de caballos especialmente al nivel de fermentación cecal.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el impacto nutritivo del uso de *Lactobacillus farciminis* como aditivo alimenticio en nutrición de caballos sobre la emisión de gases.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Determinar la producción del metano en el contenido cecal de caballos alimentados con forraje de avena y concentrado alimento comercial.

MATERIALES

Heces de 4 equinos, guantes de palpación, bacteria *Lactobacillus farciminis*, matraz erlemyer, detector Gas-Pro (Analizador de gases CROWCON Modelo Tetra3, Abingdon, Reino Unido, botellas, refrigerador, pipetas, bascula.

MÉTODO

Se recolectaron las heces directamente del ano del equino, por palpación rectal utilizando guantes de palpación.

Preparación del inóculo bacteriano

Se inoculó *Lactobacillus farciminis* (un producto comercial de SAFISIS, Toluca, México) a la concentración de 3×10^{11} CFU / g en un matraz Erlenmeyer de 1L que contenía medio fecal de solución tampón Goering y Van Soest. El cultivo de caldo se incubó a 30 ° C durante 24 h en condiciones estáticas, después de la saturación con CO₂ durante 10 min.

Sustrato y tratamientos

La dieta de paja de avena y mezcla de concentrado (DM 1: 1) se utilizó como sustrato (Tablas 1) durante la evaluación fecal in vitro. Las muestras de las dietas se secaron a 60 ° C durante 48 h en un horno de aire forzado, molido en un molino wiley para pasar a través de un tamiz de 1 mm, y almacenados en bolsas de plástico para la determinación posterior de la composición química, así como la estimación in vitro de la producción de gas. Se utilizarán cuatro dosis (0, 2, 4 y 6 mg de LAB / g de DM de sustrato) en el estudio de fermentación fecal in vitro.

Incubación *in vitro*

Se recolectó contenido fecal (fuente de inóculo) de cuatro caballos aztecas de 5 a 8 años de edad, con un peso de $480 \pm 20,1$ kg.

Los caballos fueron alimentados *ad libitum* una ración mixta total de concentrado comercial, con paja de avena a 1: 1 DM.

La misma dieta será utilizada como sustrato para las incubaciones *in vitro*. El agua estará disponible *ad libitum*.

Los contenidos fecales se recolectaron directamente del recto de cada animal, mezclado con caldo de cultivo en una proporción de 1: 4, y mantenido dispensado bajo CO₂ inmediatamente después de la extracción y durante todo el proceso de incubación *in vitro*.

Se incubaron un total de 81 botellas (tres botellas por cada dieta además de tres botellas por cada dosis de *L. farciminis* en tres corridas diferentes con tres botellas como muestras con sólo líquido) durante 48 h. Además, también se incubaron 36 botellas (tres botellas por cada dosis de *L. farciminis* en tres series diferentes con tres botellas con líquido fecal solamente) durante el mismo período de tiempo. Después de la suplementación, todas las botellas se cerrarán inmediatamente con tapones de goma, se sacudieran y se colocaran en una incubadora a 39°C. El volumen de gas, CO₂ y CH₄ producidos se estima en 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 y 48 h de incubación. Técnica de lectura de presión (instrumentos de Extech, Waltham, EE.UU.) de Theodorou et al. se utilizó para la estimación del gas producido. La producción de CH₄ y CO₂ se estima utilizando un detector Gas-Pro (Analizador de gases CROWCON Modelo Tetra3, Abingdon, Reino Unido).

Después del período requerido de incubación, los frascos se destaparon y el pH se medirá usando un pH-metro (Conductronic pH15, Puebla, México). El sustrato degradado se estimó a partir de residuos no fermentados filtrando el contenido de cada botella.

Degradabilidad y análisis de muestras

La degradabilidad y los análisis de muestras se determinaron de acuerdo con la metodología de Elghandour et al. En resumen, el proceso de fermentación se detendrá después de 48 h de incubación y el contenido de cada botella de suero se filtró a vacío utilizando crisoles de vidrio con un filtro sinterizado (porosidad gruesa n ° 1, tamaño de poro 100-160 mm, Pyrex, Stone, REINO UNIDO). La

desaparición de la DM se estimará secando los residuos de fermentación obtenidos durante la noche a 65°C.

Análisis y cálculos químicos

Las muestras de la dieta (sustrato) se analizó para DM (# 934.01), ceniza (# 942.05), y N (# 954.01) de acuerdo con AOAC. Contenido de las raciones a partir de (NDF, Van Soest et al., fibra detergente en ácido (ADF) y lignina (AOAC, 1997; # 973.18) se realizó utilizando una Unidad de Analizador de Fibra ANKOM200 (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY,) La fibra neutra en detergente se estimó usando alfa amilasa y sulfito sódico, tanto el NDF como el ADF se expresan sin cenizas residuales.

Los resultados para los parámetros cinéticos de GP (mL / g de DM) se ajustaron de acuerdo con France et al., como se describe a continuación, utilizando la opción NLIN de SAS.

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

Donde A es el volumen de GP en el instante t; b es la GP asintótica (ml / g de DM); c es la tasa de GP (mL / h), y L (h) es el tiempo de retardo discreto antes de la iniciación de GP.

La energía metabolizable (ME, MJ / kg MS) y la digestibilidad in vitro de la materia orgánica (OMD, g / kg OM) se estimaron con base en la metodología de Menke et al. como sigue:

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

$$OMD = 14,88 + 0,889 \text{ GP (ml / 0,5 g DM)} + 0,45 \text{ CP (g / kg DM)} + 0,0651 \text{ XA}$$

Donde DM es materia seca, GP es producción de gas, CP es proteína cruda y XA es el contenido de cenizas en porcentaje.

Análisis estadístico

Los datos de fermentación fecal se analizaron como un diseño completamente al azar utilizando la opción PROC GLM como se indica a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde: Y_{ij} = observación obtenida con el nivel i de LAB; B_i = nivel de LAB ($i = 1-4$); μ es la media general; ϵ_{ij} es el error experimental.

Se utilizaron contrastes polinómicos lineales y cuadráticos para evaluar las respuestas a niveles de adición crecientes de LAB. La prueba de Turquía se empleará para medir las comparaciones múltiples entre las medias. El nivel de significación se declaró a $P < 0,05$.

RESULTADOS

INFLUENCIA DE Lactobacillus farciminis SOBRE LA FERMENTACIÓN EN INTESTINO GRUESO Y PRODUCCIÓN DE GASES EN IN VITRO EN CABALLO.

(INFLUENCE OF Lactobacillus farciminis ON FERMENTATION IN LARGE INTESTINE AND PRODUCTION OF GASES ON IN VITRO IN CABALLO).

ABSTRACT

The current study was outlined to investigate the influence of fecal inocula obtained from horses supplemented with *Lactobacillus farciminis* (*L. farciminis*) in diets constituting 50% oat straw on *in vitro* gas production (GP), methane (CH₄), and carbon dioxide (CO₂) productions as indicators of hindgut activity. The experiments were assessed on four Azteca horses ranging from 5 to 8 years of age, weighing 480±20.1 kg. The treatments comprised the *in vitro* incubation of fecal inocula with commercial product of *L. farciminis* at 0, 2, 4, and 6 mg/g dry matter (DM) of substrate. The fecal content mixed with the culture media were used to inoculate into the substrate containing a mixture of commercial concentrate and oat straw (1:1 DM). The subsequent incorporation of additives resulted into increased level of asymptotic GP, CH₄, and CO₂ productions ($P<0.05$). The rate of gas production as well as initial delay before gas production begins were observed to be unaffected (linear, $P>0.05$; quadric, $P>0.05$). A significant reduction in the fermentation pH range (linear, $P=0.029$) and higher metabolizable energy (ME) values ($P=0.001$) were obtained with the supplementation of *L. farciminis* in a dose dependent manner, whereas no impact of additives were reported on DMD (dry matter degraded) values ($P>0.05$). The *in vitro* GP, CH₄, and CO₂ productions were measured up to 48 h post incubation using standard methodology, and depicted

higher responses. The additives at varied concentrations resulted in increased *in vitro* GP, CH₄, and CO₂ productions (linear, $P \leq 0.001$) from 6 to 48 h of incubation. In conclusion, the dose dependent addition of *L. farciminis* (2 to 6 mg/g DM of diet) found to be persuasive in terms of attaining amicable hindgut fermentation in order to digest fibrous forage by horses without any side effect.

Key words- Fecal inocula; Gas production; Horse; *L. farciminis*

INTRODUCTION

Horses belong to non-ruminant herbivores where the hindgut represents a fermentative chamber for dynamic and diversified microbiota. These microbes ferment the fibers gradually and endow horses to prosper on a high-fiber forage-rich feed in order to retain their normal digestive system. Volatile fatty acids, obtained through the fermentation of fibers, are the dominant energy sources (>50%) of horses (Megan, 2012). Likewise, starch rich forage such as cereal grains are important caloric sources in concentrate feeds used for horses. However, feeding high-starch grain diets is associated with some feeding disorders such as gastric ulceration, hindgut acidosis, laminitis, endotoxemia, and colic (Rowe, 1994). Additionally, feeding high grain diets to horses may alter the starch digestibility in the small intestine, thereby causing microbial disturbance as well as alteration of the fibrolytic activity in the hindgut (Potter, 1992). It results in the reduction of the energy utilization of the diet. In view of this, there is an urgency to formulate fiber-based diets constituting lower amount of starch and sugar in order to acquire the energy demands of the horses, and maintain their health and integrity by reducing incidence of such feeding disorders. In the present scenario, there has been a

concomitant increase in the demand to enhance the athletic high-level performances of modern horses. This aim could be achieved by developing new feeding strategies in order to meet the necessary nutrient requirements of horses.

The health benefits of consuming probiotics, especially Lactic acid bacteria (LAB) have created immense interest among researchers globally. Lactic acid bacteria are live microorganisms when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host, thereby generally regarded as safe (FAO/WHO. 2001). The genus *Lactobacillus* belongs to LAB and maintains the stability of the gastrointestinal tract, preventing intestinal infections and generally supporting host health (Gu, 2008).

Lactic acid bacteria associated probiotics are known to affect the rate of gas production in monogastric animals (ruminants and non-ruminants) after the fermentation process. Previously, (Tsukahara et al., 2001) reported a significant reduction in the intestinal gas production, particularly CO₂ in pigs due to the supplementation of live LAB. Further, authors estimated a significant increment in hydrogen sulphide (H₂S) production, and observed a negative correlation between the rate of H₂S and methane (CH₄) production. In contradictory to this, (Takahashi et al. 2000), demonstrated the impact of probiotics on rumen methanogenesis, and revealed the enhanced fermentation kinetics as well as total gas, CH₄ and CO₂ production after a particular time period. In general, the fermentation potentiality of probiotics is predominantly associated with chemical constituents of the feeding diet.

At present, the utilization of *Lactobacillus* sp. as feeding system in horses is scanty. *Lactobacillus* sp. are thought to be beneficial to the horse not only because

of their metabolic contribution but also their ample contribution in competitive exclusion of several pathogens (Collins, 1999). To the best of our knowledge, no research activities have been carried out in the field of equine probiotic strategy, revealing the impact of lactobacilli, particularly *Lactobacillus farciminis* (*L. farciminis*) on the gas production in horses. However, few investigations have reported the beneficial impact of exogenous lactobacilli and other probiotics in horses towards digestibility and fermentation end-products, and acute enterocolitis treatment respectively (Desrochers. 2005., Swyers. et al., 2008). Certain species of lactobacilli have potentiality for ecological competition. For example, *Lactobacillus reuteri*, a member of the equine normal microbiota, can produce antimicrobial components (Wells, 1997., Bernard, 2011). In addition to this, few lactobacilli are non-homolactic.

Based on the previous investigations, it is hypothesized that *Lactobacillus* sp. may enhance the digestion of poor-quality high-fiber feeds (such as oat straw) in the hindgut of horses. Keeping in view of this, the current study was conducted to outline the impact of exogenous lactobacilli (*L. farciminis*) on the microbial fermentation activity in the hindgut of horses as well as its influence on the digestion of a high fiber substrate (oat straw).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of bacterial inoculum

L. farciminis (a commercial product of SAFISIS, Toluca, Mexico) was inoculated at the concentration of 3×10^{11} CFU/g into 1L Erlenmeyer flask containing rumen medium of Goering and Van Soest (Goering. Van Soest .1970), buffer

solution. The broth culture was incubated at 30°C for 24 h under static conditions, after saturation with CO₂ for 10 min.

Substrate and treatments

Diet of oat straw and concentrate mixture (1:1 DM) was used as a substrate (Tables 1) during the *in vitro* fecal evaluation. Samples of the diets were dried at 60°C for 48 h in a forced air oven, ground in a wiley mill to pass through a 1 mm sieve, and stored in plastic bags for subsequent determination of chemical composition as well as estimation of *in vitro* gas production. Four doses (0, 2, 4 and 6 mg LAB/ g DM of substrate) were used in *in vitro* fecal fermentation study.

Table 1. Chemical composition of ingredients and total mixed ration used (g/kg DM).

	Organic matter	Crude protein	Neutral detergent fiber	Acid detergent fiber
Concentrate	901.8	112	511	202.8
Oat straw	929.4	26.7	668.7	405.1
Total mixed ration	915.6	69.4	589.8	303.9

***In vitro* incubation**

Fecal content (inoculum source) was collected from four Azteca horses ranging from 5 to 8 years of age, weighing 480±20.1 kg. Horses were fed *ad libitum* a total mixed ration of commercial concentrate (PURINA®, Toluca, Mexico) with oat straw at 1:1 DM; the same diet used as a substrate for the *in vitro* incubations. Fresh water was made animals available one week before collection

phase. Fecal contents were collected directly from the rectum of each animal, mixed with culture broth in a ratio of 1:4, and kept dispensed under CO₂ immediately after extraction and during all the *in vitro* incubation process.

A total of 81 bottles [three bottles for each diet in addition to three bottles for each *L. farciminis* dose in three different runs with three bottles as blanks (rumen fluid only)] were incubated for 48 h. Additionally, 36 bottles [three bottles for each *L. farciminis* dose in three different runs with three bottles as blanks (fecal fluid only)] were also incubated for the same time period. After the supplementation, all bottles were immediately closed with rubber stoppers, shaken, and placed in an incubator at 39°C. The volume of gas, CO₂ and CH₄ produced was estimated at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, and 48 h of incubation. Pressure reading technique (Extech instruments, Waltham, USA) of (Theodorou *et al.* 1994) was used for the estimation of gas produced. The production of CH₄ and CO₂ was estimated using Gas-Pro detector (Gas Analyzer CROWCON Model Tetra3, Abingdon, UK).

After required period of incubation, bottles were uncapped and pH was measured using a pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico). The degraded substrate was estimated from non-fermented residues by filtering the content of each bottle.

Degradability and sample analysis

Degradability and sample analyses were determined according to the methodology of (Elghandour *et al.* 2014). In a nutshell, the fermentation process was stopped after 48 h of incubation, and the contents of each serum bottle were filtered under vacuum using glass crucibles with a sintered filter (coarse porosity

no. 1, pore size 100-160 mm; Pyrex, Stone, UK). The DM disappearance was estimated by drying the obtained fermentation residues overnight at 65°C.

Chemical analyses and calculations

Samples of the diet (substrate) were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), and N (#954.01) according to (AOAC. 1997). Rations contents from neutral detergent fiber content (NDF, Van Soest *et al.* 1991), acid detergent fiber (ADF), and lignin (AOAC, 1997; #973.) (France. *et al.*,2000) analyses were carried out using an ANKOM200 Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA). Neutral detergent fiber was estimated using alpha amylase and sodium sulfite. Both NDF and ADF are expressed without residual ash.

Results for kinetic parameters of GP (mL/g DM) were fitted according to (France *et al.*, 2000) as described below using the NLIN option of (Co SAS. 2002).

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

where, A is the volume of GP at time t; b is the asymptotic GP (ml/g DM); c is the rate of GP (mL/h), and L (h) is the discrete lag time prior to the initiation of GP.

Metabolizable energy (ME, MJ/kg DM) and *in vitro* organic matter digestibility (OMD, g/kg OM) were estimated based on the methodology of (Menke *et al.* 1979) as follows:

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

$$OMD = 14.88 + 0.889 \text{ GP (mL/0.5 g DM)} + 0.45 \text{ CP (g/kg DM)} + 0.0651 \text{ XA}$$

where, DM is dry matter, GP is gas production, CP is crude protein, and XA is ash content in percentage.

Statistical analyses

Fecal fermentation data were analyzed as a completely randomized design using the PROC GLM option as given below:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + \varepsilon_{ij}$$

where: Y_{ij} = observation obtained with i^{th} level of LAB; B_i = level of LAB ($i=1-4$); μ is the general mean; ε_{ij} is the experimental error.

Linear and quadratic polynomial contrasts were used to evaluate responses for increasing addition levels of LAB. Turkey's test was employed to measure the multiple comparisons among means. Significance level was declared at $P < 0.05$.

RESULTS

The supplementation of LAB in a dose dependent manner caused higher asymptotic GP (linear effect, $P=0.001$), asymptotic CH_4 production (linear, $P=0.021$; quadratic, $P=0.034$), and asymptotic CO_2 production (linear, $P=0.042$; quadratic, $P=0.031$). On the other hand, treatments had no impact ($P > 0.05$) not only on the rate of GP, CH_4 , and CO_2 production but also lag times for GP, CH_4 , and CO_2 production (Table 2).

The inclusion of LAB at 2, 4, and 6 mg/g DM had affected the ME (linear, $P=0.001$), whereas there was no effect observed on the DMD ($P > 0.05$) of fermentation profile in a comparison with the control. The fermentation pH was slightly lower ($P=0.029$) with the diverse doses of LAB (Table 2).

Table 2. *In vitro* horse fecal gas kinetics, methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) productions and fermentation kinetics of a total mixed ration of oat straw and concentrates (1:1) as affected by different levels of lactic acid bacteria (LAB, mg/g DM of substrate).

LAB doses	Gas production ¹			CH ₄ production ²			CO ₂ production ³			Fecal fermentation kinetics ⁴		
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>L</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>L</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>L</i>	pH	ME	DMD
0	150.6	0.136	1.56	32.1	0.016	3.48	93.8	0.0178	5.11	6.82	7.01	0.500
2	166.2	0.132	1.79	35.5	0.015	3.99	103.5	0.0173	5.86	6.80	7.42	0.469
4	192.0	0.141	1.76	41.0	0.016	3.92	119.6	0.0184	5.77	6.73	8.14	0.477
6	208.8	0.148	1.91	44.6	0.017	4.26	130.0	0.0194	6.26	6.73	8.61	0.503
SEM ⁵	5.90	0.0079	0.082	2.34	0.0011	0.126	3.65	0.0012	0.362	0.026	0.142	0.0125
Linear	0.001	0.709	0.128	0.021	0.122	0.235	0.042	0.142	0.32	0.029	0.001	0.228
Quadratic	0.498	0.501	0.251	0.034	0.241	0.521	0.031	0.354	0.421	0.451	0.405	0.237

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

²*b*, asymptotic methane production (mL/g DM); *c* is the rate of methane production (/h); *L*, is the initial delay before methane production begins (h).

³*b*, asymptotic carbon dioxide production (mL/g DM); *c* is the rate of carbon dioxide production (/h); *L*, is the initial delay before carbon dioxide production begins (h).

⁴DMD, DM degraded substrate (mg/g DM); ME, metabolizable energy (MJ/kg DM).

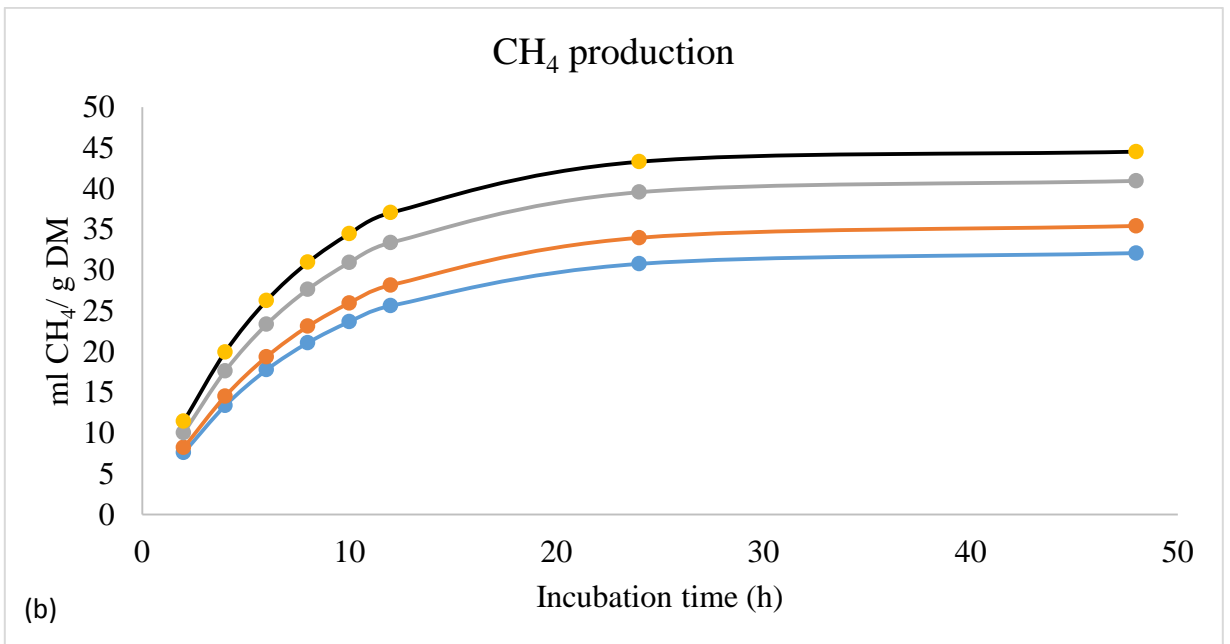
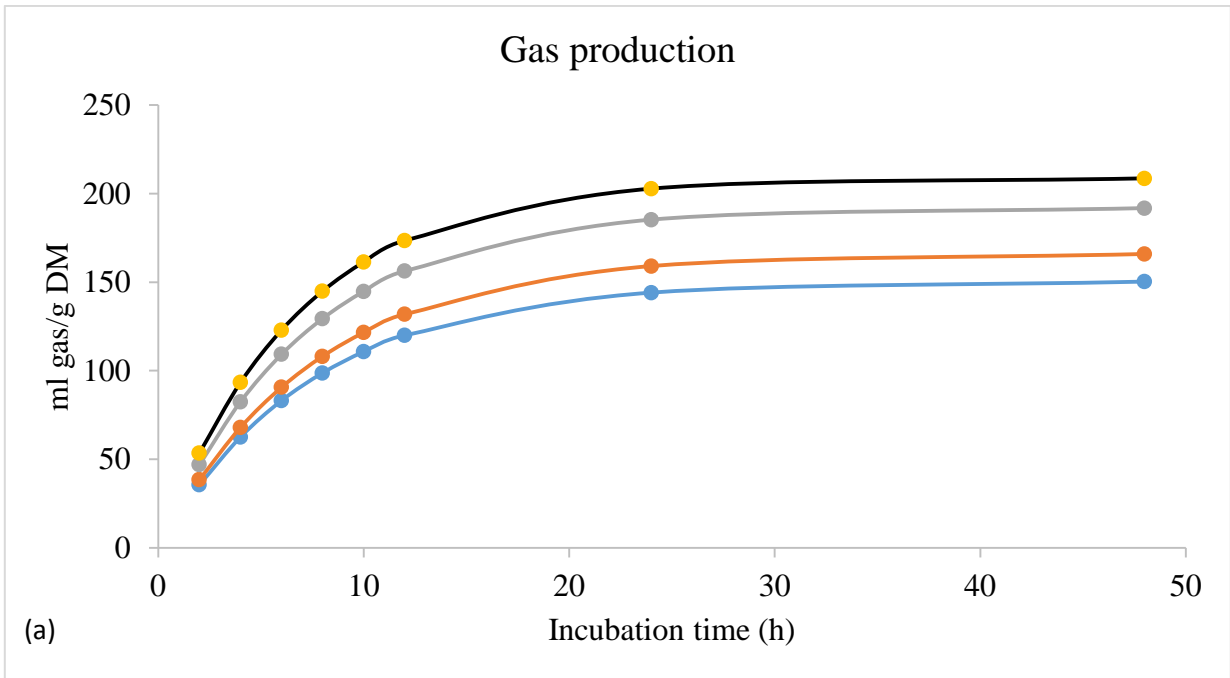
⁵SEM, standard error of the mean.

The treatment of LAB at the doses of 2, 4, and 6 mg/g DM resulted into the increased *in vitro* GP (linear, $P=0.001$) from 6 to 48 h (Table 3, Fig. 1a). At 6 to 48 h of incubation, CH₄ production was increased (linear, $P=0.001$) compared with the control (Table 3, Fig. 1b). In like manner, addition of LAB at all concentrations affected CO₂ production (linear, $P<0.001$) after 6, 24, and 48 h of incubation compared to control treatment (Table 3, Fig. 1c).

Table 3. *In vitro* horse fecal gas, CH₄ and CO₂ production (ml/g DM) of a total mixed ration of oat straw and concentrates (1:1), at 6, 24 and 48 h of incubation, as affected by different levels of lactic acid bacteria (LAB, mg/g DM of substrate).

LAB doses	<i>In vitro</i> gas production			CH ₄ production			CO ₂ production		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
0	83.2	144.1	150.3	17.8	30.8	32.1	51.8	89.7	93.6
2	90.7	159.1	165.9	19.4	34.0	35.4	56.5	99.1	103.3
4	109.3	185.3	191.8	23.3	39.6	40.9	68.1	115.4	119.5
6	123.0	202.8	208.6	26.3	43.3	44.5	76.6	126.3	129.9
SEM ¹	3.02	5.23	5.85	0.64	1.12	1.25	1.9	3.3	3.6
Linear	0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.0	0.0	0.0
Quadratic	0.177	0.406	0.492	0.038	0.087	0.105	0.1	0.3	0.3

¹SEM, standard error of the mean.



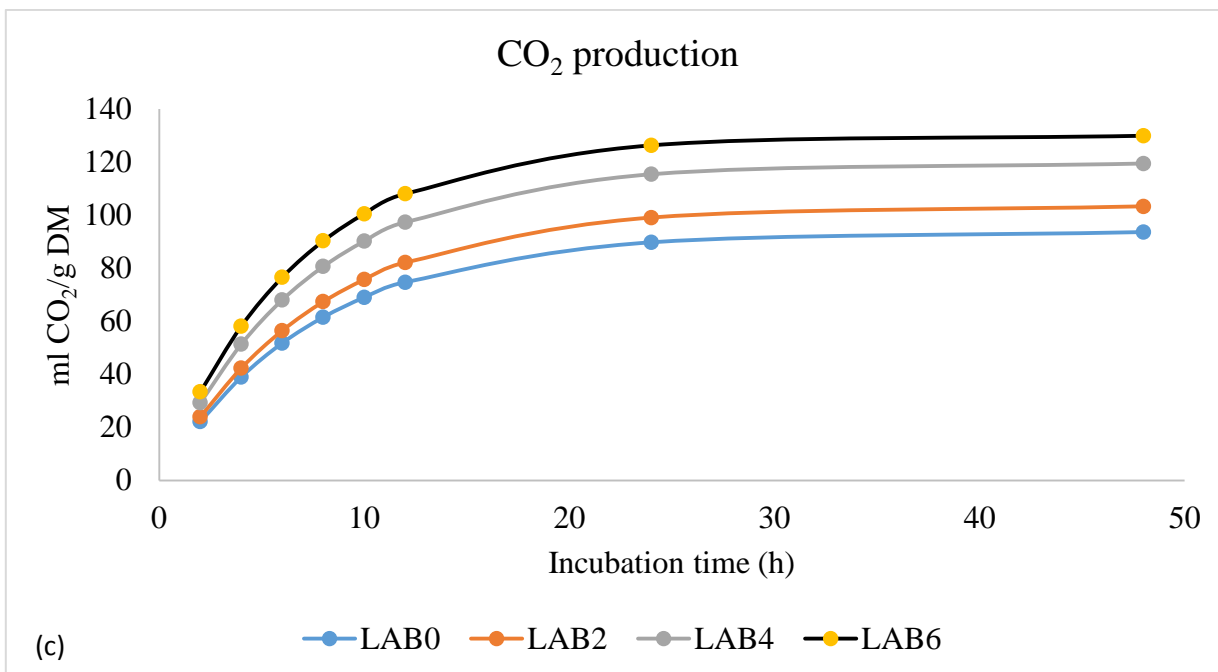


Fig. 1. *In vitro* fecal gas, CH₄ and CO₂ productions (mL/g incubated DM) of a total mixed ration of oat straw and concentrates (1:1) as affected by different levels of lactic acid bacteria (LAB, mg/g DM of substrate). at 0, 2, 4 and 6mg/g DM of the substrate.

DISCUSSION

In the last few years, equine nutritionists have concentrated to mitigate the risks associated with feeding high-starch concentrates to horses. Much of this effort has been focused around the supplementation of probiotics into the diets. High concentrate fed diets supplemented with direct-fed microbials or probiotics had reduced risk of several disorders. Probiotics are used as feed additives that enhance intestinal microbial balance and digestive health in the host animal. Lactic acid-producing bacterial species, predominantly from the *Lactobacillus* genus are the most commonly used probiotics in animal feed preparations (Krehbiel. 2003). In spite of the broad application of LAB in the feed preparations intended for equine,

no peer-reviewed research has evidenced the efficacy of either a single strain or a multiple strain LAB-based feeding diet, particularly as it relates to nutrient digestion, *in vitro* gas, CH₄ and CO₂ production, and fermentation kinetics in mature horses.

Previously, a tremendous effort had been undertaken to assess the impact of direct-fed microbial (LAB) supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low- and high-starch concentrates (Swyers. 2008). Study demonstrated that the supplementation of *Enterococcus faecium* caused increased ether extract (P<0.05) and decreased Na (P<0.1) digestibilities. In like manner, LAB-supplemented horses showed increased Cu (P<0.05), Fe, and Zn digestibilities. Further, authors demonstrated that the supplementation of LAB in equine diets had limited influence on the nutrient digestibility as well as avoiding acidosis associated with feeding high-starch concentrates to horses.

Probiotic supplements intended for horses may aid in supporting digestive health, promote efficient digestion, inhibit the growth of pathogenic bacteria, reduce side effects associated with antibiotic administration, increase lactation in mares, increase growth in foals, and reduce the incidence of various disorders. In the present study, a successful attempt had been undertaken to fulfil the gap of equine research and demonstrated *in vitro* cumulative gas, CH₄, and CO₂ productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with *L. farciminis*.

At present, *in vitro* fermentation, techniques are being incorporated in order to investigate the nutritional response of equine feeding diets using feces as inoculums sources. In this context, the supplementation of the varied doses of *L.*

farciminis resulted in higher asymptotic GP, CH₄, and CO₂ production. This may be attributed to the viable cell counts, strain specific *L. farciminis*, and nutritional composition of the diet. In general, feeding the donor horses with the diversified concentrations of *L. farciminis* improved the fecal fermentation, thereby causing the increased asymptotic GP during fermentation. In the line of our findings, previous reports had also depicted the improved microbial balance in the hindgut of horses and increased digestibility of feeds with increasing efficiency of energy utilization due to the supplementation of live microbes (Lattimer 2005). In the present study, the volume of gas produced demonstrated the fermentation activity of the inoculum used, and the potential of each additive to further stimulate such property (Elghandour et al., 2014). Moreover, GP depends on the availability of nutrients for the microbial fermentation and its further stimulation for nutrients degradability (Ahmed, 2007). Gases such as H₂, CH₄, and CO₂ are mainly produced due to the fermentation of dietary carbohydrates to acetate, propionate, and butyrate.

Lactic acid bacteria additives and its respective doses had no impact on the fermentation rate as well as lag time. The outcomes of this investigation are in contrast to (Murray et al., 2008 and Elghandour et al., 2014), who estimated reduction in the rate of GP in response to the inclusion of live microbes. These variations may be due to the types and nutritional composition of substrates used.

The influence of various doses of *L. farciminis* was observed for pH, ME and DMD. The inoculation of exogenous lactobacilli mitigated pH. The amelioration of decline in pH range was observed to be dose dependent addition of lactobacilli. In fact, in some cases additions <10⁸ cells/mL led to greater pH decline, while 10⁸ cells/mL additions increased pH relative to control substrate. Lactobacilli are

amylolytic bacteria that produce lactic acid, so it is reasonable that they would decrease pH (Harlow, 2017). The dose-response relationship and the inconsequence of viability, indicate that the mechanism by which pH decline was inhibited could be pre-formed antimicrobial components. Therefore, exogenous lactobacilli at lower concentrations could have grown *in situ*, contributing greater lactic acid production and consequent pH decline. In contrast, the addition of lactobacilli at higher concentrations could have an antimicrobial effect on more efficient amylolytic bacteria, decreasing lactate production and pH decline (Harlow, 2017). Similarly, the inoculation of lactobacilli caused increased ME. Addition of *L. farciminis* is likely to stimulate the microbial activity in the hindgut causing an improved nutrient digestion. However, the additives at various doses did not affect DMD significantly.

The fermentation was carried out up to 48 h, and the *in vitro* GP, CH₄, and CO₂ production were estimated accordingly in the presence of various doses of LAB. The study depicted the increased rate of *in vitro* GP, CH₄, and CO₂ production after 48 h of incubation in LAB concentration dependent manner. According to (Agazzi et al., 2011), the average mean retention time for feed passing through the gut of the horse ranges between 36-38 h. The incubation of either grains or forages with feces as a source of inoculum is known to produce significant amounts of fermentation gas with increased lag phase (Lowman. 1999). This might be due to the presence of different concentration of microorganisms per millimeter of feces (Giraldo, 2007). In general, the influence of probiotics is dependent on several factors viz. source, type and dose of microbes, and type of diets fed to the animals (Giraldo, 2007). In contradictory to the present study,

(Mwenya et al., 2004), had reported that live microorganisms such as yeast has the potentiality to shift H₂ utilization from methanogenesis to reductive acetogenesis through the homoacetogenic bacteria, thereby releasing acetate from CO₂ and H₂. In another report, (Lynch and Martin. 2002) demonstrated a 20% reduction in CH₄ production after a 48 h incubation of alfalfa inoculated with a live microbial product. In like manner, (Newbold and Rode. 2006) reported the significant reduction in CH₄ production due to the supplementation of live yeast cells.

CONCLUSION

L. farciminis at 2 to 6 mg/g DM of diet was recommended to be a potential probiotic agent towards the improvement of GP and fermentation kinetics. . The outcomes of the present context clearly indicate that *L. farciminis* can be fed to the horses at suggested doses, in order to improve the hindgut digestion of high-fiber roughages such as oat straw. However, further *in vivo* studies need to be investigated in order to characterize the effect of LAB supplementation on fermentation kinetics in the hindgut of horses. Another *in vivo* study also needs to be investigated for demonstrating the mechanism of action of varied doses of LAB on the fermentation process in horse.

Conflict of interest

None declared

LÍMITE TIEMPO Y ESPACIO

Como límite de espacio el trabajo se llevó a cabo en el Hospital Veterinario de Grandes Especies, laboratorio de bromatología, biblioteca física y digital de la Universidad Autónoma del Estado de México con el siguiente cronograma de actividades como límite de tiempo.

Actividad	Enero- Agosto 2017	Septiembre- Diciembre 2017	Enero- Abril 2018
Colecta de información redacción de protocolo.	X	X	X
Colección de heces.	X		
Realizar las evaluaciones in vitro con el contenido fecal de caballos	X	X	
Introducción de datos a la computadora para posteriores análisis estadísticos.		X	X
Redacción del artículo científico		X	X
Enviar el artículo científico a una revista así como aplicar el examen profesional para obtener el título de médico veterinario Zootecnista			X

REFERENCIAS

- Agazzi A, Ferroni M, Fanelli A, Marocco A, Invernizzi G, Dell'Orto V, Savoini G. 2011. Evaluation of the effects of live yeast supplementation on apparent digestibility of high fiber diet immature horses using the acid insoluble ash marker modified method. *J Equine Vet Sci*;31:13–8.
- Ahmed GM, Abdel NM. 2007. Chemical composition and in vitro gas production characteristics of six fodder trees, leaves and seeds. *Res J Agric Biol Sci*;3:983–6.
- Angelis M. Gobbetti M. 2011. *Lactobacillus* spp.: General Characteristics.3: 1479–1484.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1997. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington, VA, USA: AOAC.
- Bernard WV, Sebastian M, Hemming B. 2011. Salmonella antimicrobial activity of selected strains of enterolactobacillus species isolated from the gastrointestinal tract of the horse. *J Equine Vet Sci*. 31: 396±399.
- Björkrothand J. y Koort J. 2011. Taxonomy and Biodiversity. *Journal of Biodiversity* 3: 1470–1478.
- Boulot, 1987. S. L'ingestion chez la jument. Etude de quelques facteurs de variation au cours du cycle gestation-lactation; implications nutritionnelles et métaboliques. Tesis doctoral, Universidad de Rennes.
- Co SAS. User's guide: statistics, version 9.0. Cary, NC: SAS Institute; 2002.
- Coenen, M. German feedings standards. En Pagan, J.D., Geor, J. (dir.), *Advances in equine nutrition II*. Thrumpton (United Kingdom): Nottingham University Press, 2001, p. 365-378. ISBN 1-897676-78-6.
- Costa P. 1993. Alimentación del Caballo. Dossier, 1-5.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*. 69: 1052s±1057s.
- Cunha T. 1991. *Horse Feeding and Nutrition*. California: Academic press inc.
- De León Lucía. 2001. Tesis de grado. Universidad de Panamá. Efecto de suplementación dietética a base de levaduras vivas de *Sacharomyces*

cerevisiae, sobre el desempeño en potros pura sangre durante la etapa de crecimiento.

- Desrochers AM, Dolente BA, Roy MF, Boston R, Carlisle S. 2005. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* for treatment of horses with acute enterocolitis. *J Am Vet Med Assoc.* 227: 954±959. PMID: 16190596
- Dyce K. M. Sack W. Wensing C. J. G. (2012) Anatomía veterinaria. 4^o Edición. México. Editorial Manual Moderno.
- Edouard, N.2007. Food intake in horse: does vegetation quality matter. Disponible en: <<http://www.cebc.cnrs.fr/Forga/Identite/Edouard/EdouDEA.pdf>>
- Elghandour MMY, Vázquez Chagoyán JC, Salem AZM, Kholif AE, Martínez Castañeda JS, Camacho LM, Buendía G. 2014. In vitro fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Equine Vet Sci*;34:619–25.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Rome: FAO.
- Fioramonti Jean, Bueno Lionel, Theodorou Vasilía, Lamine Florence. 2000 Use of *Lactobacillus farciminis* for the prevention or treatment of digestive pathologies US 7294337 B2 Institut National De La Recherche Agronomique (Inra) Pp: 22
- Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.
- Frape, D. 1992 Nutrición y alimentación del caballo. Zaragoza (España): Editorial Acribia. ISBN 84-200-0724-2.
- France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, López S, Bannink A. 2000 Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *Br J Nutr*;83: 143–50.
- Garner, H.E., Moore, J.N., Johnson, J.H., Clark, L., Amend, J.F., Tritschler, L.G., Coffman, J.R., Sprouse, R.F., Hutchenson, D.P., Salem, C.A. 1977. In the cecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J*, vol. 10, n^o 4, p. 149-252

- Giraldo LA, Carro MD, Ranilla MJ, Tejido ML, Mohamed AH. 2007. In vitro ruminal fermentation of low-quality forages as influenced by the treatment with exogenous fibrolytic enzymes. In: Priolo A, Biondi L, Ben Salem H, Morand-Fehr P, editors. Advanced nutrition and feeding strategies to improve sheep and goat. Zaragoza, Spain: CIHEAM; p. 263–7.
- Goering M. K. Van Soest P. J. 1970. Forage fibre analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC, USA: Agricultural Research Service, USDA.
- González, M. G. 2007. Bases de la Nutrición del Equino en Entrenamiento. en g. g. libro, fisiología del ejercicio en equinos. págs. 1-5. Ed. Inter-Médica.
- Gu R.X., Zhen-Quan Yang Z.Q., Li Z.H., Chen S.L., Luo Z.L. 2008. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe* 14: 313–7.
- Harris, P.A. 2007. How understanding the digestive process can help minimise digestive disturbances due to diet and feeding practices. Disponible en URL: <http://www.effemequine.com/Waltha%20Horse/nutritional_aspects/digestive_processes.html>
- Harlow BE, Lawrence LM, Harris PA, Aiken GE, Flythe MD. 2017. Exogenous lactobacilli mitigate microbial changes associated with grain fermentation (corn, oats, and wheat) by equine fecal microflora ex vivo. *PLoS ONE* 12(3): e0174059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174059>.
- Hoffman, R. M. 2003. Carbohydrate Metabolism in Horses. *ivis* , 1-14.
- Hurst A. (1981) Nisin. *Avances en Microbiología Aplicada*, 27, 85-123. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70342-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70342-3).
- INRA. 1990. L'Alimentation des chevaux. Editado por W. Martin-Rosset. París (Francia): Editorial INRA. ISBN 2-738-00194-7.
- INRA. 2002. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. Editado por Sauvart, D., Perez, J.M., Tran, G. Paris (Francia): Editorial INRA. ISBN 2-7380-1046-6.
- Jarridge, R. 1981. Les constituants glucidiques des fourrages: variations, digestibilité et dosage. En Demarquilly, C. (dir.), *Prévision de la valeur*

nutritive des aliments des ruminants. Paris (Francia): Editorial INRA, p. 13-40. ISBN 2-85340-375-0.

- Jarridge, R., Tisserand. 1984 J.L. Nutrition et alimentation azotées. En Jarrige, R., MartinRosset, W. (dir.), Le cheval. Reproduction, sélection, alimentation, exploitation. Paris (Francia): Editorial INRA, p. 277-302. ISBN 2-85340-605-9.
- Krehbiel, C. R., S. R. Rust, G. Zhang, and S. E. Gilliland. 2003. Bacteria direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):120-132.
- Lowman RS, Theodorou MK, Hyslop JJ, Dhanoa MS, Cuddeford D. 1999. Evaluation of an in vitro batch culture technique for estimating the in vivo digestibility and digestible energy content of equine feeds using equine faeces as the source of microbial inoculum. *Anim Feed Sci Technol*;80:11-27
- Lattimer JM, Cooper SR, Freeman DW, Lalman DA. 2005. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro fermentation of a high concentrate or high fiber diet in horses. *Proceedings of the 19th Symposium of the Equine Science Society, Tucson, AZ*; p. 168–173.
- Lynch HA, Martin SA. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J Dairy Sci*;85:2603–8.
- Marcus Clauss. 2013. Digestive Physiology and Feeding Behaviour of equids . *IVIS* , 2-10.
- Martin-Rosset, W. 2001. Feeding standards for energy and protein for horses in France. En Pagan, J.D., Geor, J. (dir.), *Advances in equine nutrition II*. Thrumpton (United Kingdom): Nottingham University Press, p. 245-303. ISBN 1-897676-78-6.
- McDonald, P. R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C.A. Morgan. 2006. *Nutrición Animal*.
- Megan L. Shepherd, William S. Swecker Jr, Roderick V. Jensen & Monica A. Ponder. 2012. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiol Lett* 326 62–68
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979 The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of

- ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J Agr Sci*;92: 217–22.
- Murray JMD, Longland A, Dunnett C. 2008. Effect of yeast supplementation on the in vitro fermentation of high-temperature dried lucerne incubated with equine faecal inoculum. *Anim Feed Sci Technol*;146:149–59.
 - Munizaga Caro Cesar, DVM. 2014. Sistema Digestivo Postdiafragmático. UST, 1-32.
 - Mwenya B, Santoso B, Sar C, Gamo Y, Kobayashi T, Arai I, Takahashi J. 2004. Effects of including 1,4-galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Anim Feed Sci Technol*; 115:313–26.
 - Newbold CJ, Rode LM. 2006. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *Int Congr Ser*;1293:138–47.
 - NRC. 2007. National Research Council Board on Agriculture and Natural Resources Committee on nutrient requirements of horses.
 - Olivera J. 2011. Caracterización Tecnológica de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Leche. Tesis de Licenciatura. Unidad Tecnológica de Alimentos. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica.
 - Ortiz A. y Mallo J.J., 2013. Probióticos: Conceptos. Norel S.A.
 - Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. 2004. Microbiología. 5ª. Mc Graw Hill. México. 371-375.
 - Potter GD, Arnold FF, Householder DD, Hansen DH, Brown KM. 1992. Digestion of starch in the small or large intestine of the equine. *Proceeding of the Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes. Hannover, Germany*; p. 107–111.
 - Ralston, S.L. 1984. Controls of feeding in horses. *J. Anim. Sci.* 59: 1354-1361
 - Real Venegas Cesar Octavio. 2010. Zootecnia Equina. Trillas. p. 20-250
 - Reuter G. 1983. *Systematic and applied microbiology*, - Elsevier.
 - Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C y Cummings JH. 1995 Colonic microflora: nutrition and health. *Nutr Rev*, 53:127-130.
 - Rowe JB, Lees MJ, Pethick DW. 1994. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J Nutr*;124: 2742S–4S.

- Samaniego F. L. M. Sosa del Castillo M. 2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Cuba. Editorial Universitaria. 10-21
- Swyers KL, Burk AO, Hartsock TG, Ungerfeld EM, Shelton JL. 2008. Effects of direct-fed microbial supplementation on digestibility and fermentation end-products in horses fed low- and high-starch concentrates. *J Anim Sci*;86(10):2596-608.
- Takahashi J, Miyagawa T, Kojima Y, Umetsu K. 2000 Effects of Yucca Shidigera Extract, Probiotics, Monensin and L-Cysteine on Rumen Methanogenesis. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 13 Supplement July A: 499-501
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A. 1994. simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* , 48:185–97.
- Tsukahara T, Azuma Y, Ushida K. 2001. The Effect of a Mixture of Live Lactic Acid Bacteria on Intestinal Gas Production in Pigs, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13:2, 105-110
- Vandelle, M., Teller, E. & Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Amm.*, Berlin 40:507
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*; 74:3583–97.
- Watkins, B.A. Kratzer, F.H. 1990 Effect of oral dosing of *Lactobacillus* strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poult. Sci.* Pp. 2088.
- White, N.A. 2006. Equine colic. In: *Proc. Amer. Assoc. Equine Practnr.* Pp 52-109-174.
- Wells JE, Krause DO, Callaway TR, Russell JB. 1997. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiol Eco.* 22: 237±243.