



## Eficiência da adição de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a taxa de produção de gases totais e degradabilidade *in vitro* da matéria seca a partir de inóculo fecal de equinos

[Efficiency of the addition of *Saccharomyces cerevisiae* on the rate of total gas production and *in vitro* degradability of dry matter from fecal inoculum of horses]

### “Artigo Científico/Scientific Article”

Antonio Brito **Silva Filho**<sup>1\*</sup>, Alisson Vinícius Mota de **Macedo**<sup>1</sup>,  
Ana Lúcia **Teodoro**<sup>2</sup>, Alana Emília Soares de França **Queiroz**<sup>3</sup>, Guilherme Rocha **Moreira**<sup>4</sup>,  
Maria Lindomárcia Leonardo **Costa**<sup>5</sup>, Jorge Eduardo Cavalcante **Lucena**<sup>1</sup>,  
Juliano Martins **Santiago**<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), Garanhuns-PE, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Paulistana-PI, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Estatística e Informática, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, Brasil.

<sup>6</sup>Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada-PE, Brasil.

\*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: [antoniobrito.vet@gmail.com](mailto:antoniobrito.vet@gmail.com)

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da utilização de *Saccharomyces cerevisiae* sob a taxa de produção de gases totais e degradabilidade *in vitro* da matéria seca de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) por meio de incubação *in vitro* de inóculo fecal de equinos. Quatro potros clinicamente saudáveis da raça Campolina alimentados com feno de Tifton 85 foram utilizados para obtenção do inóculo fecal usado no experimento. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema de parcelas subdivididas. As parcelas (tratamentos) foram constituídas pela adição ou não (controle) de 5 mg/g de *Saccharomyces cerevisiae*, e as subparcelas compostas pelos horários de avaliação da produção de gases (4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas), com sete repetições por tratamento (amostras de feno). A utilização da levedura não influenciou a produção de gases totais, não tendo efeito sobre os parâmetros cinéticos de fermentação e na degradabilidade da matéria seca do Tifton 85. Concluiu-se que a adição de 5 mg/g de *Saccharomyces cerevisiae* diretamente ao inóculo fecal não tem efeito sobre a taxa de produção de gases totais e degradabilidade *in vitro* da matéria seca de Tifton 85.

**Palavras-chave:** cavalos; fermentação; levedura; mitigação; Tifton 85.

### Abstract

The objective of this work was to evaluate the effects of the use of *Saccharomyces cerevisiae* under the total gas production rate and *in vitro* degradability of Tifton-85 dry matter (*Cynodon Dactylon*) through *in vitro* incubation of fecal inoculum of horses. Four clinically healthy foals of the Campolina breed fed Tifton-85 hay were used to obtain the fecal inoculum used in the experiment. The experimental design was completely randomized in a split-plot scheme. The plots (treatments) consisted of the addition or not (control) of 5 mg/g of *Saccharomyces cerevisiae*, and the subplots composed by the evaluation times of the gas production (4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours), with seven replications per treatment (Hay samples). The use of yeast did not influence the production of total gases, having no effect on the kinetic parameters of fermentation and on the degradability of the dry matter of Tifton 85. It was concluded that the addition of *Saccharomyces cerevisiae*, at a dosage of 5 mg/g of incubated dry matter, directly to the fecal inoculum has no effect on the rate off total gas production and *in vitro* degradability of Tifton 85 dry matter.

**Keywords:** horses; fermentation; yeast; mitigation; Tifton 85.

## Introdução

Apesar da importância da agropecuária para a produção de alimentos e geração de renda, muito se discute sobre o impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente relativo às mudanças climáticas. A pecuária brasileira, em especial, vem sendo criticada por emitir quantidades significativas de gases de efeito estufa, representando uma das maiores fontes de produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). A produção desses gases de forma indireta ocorre por meio de atividades produtoras de alimentação animal e conversão de florestas em pastagens e, de forma direta, por meio do manejo de dejetos animais e da fermentação entérica destes (Machado et al., 2011; Hristov et al., 2013).

Os animais ruminantes, por exemplo, são responsáveis por cerca de 17% do metano produzido e de 3,3% das emissões globais de gases do efeito estufa (Knapp et al., 2014). Animais herbívoros, como equinos, asininos e muares emitem maior quantidade de metano que outros monogástricos, em decorrência da alimentação mais fibrosa, que é submetida à intensa fermentação microbiana no intestino. Desta forma, o aumento na população de equídeos em todo o mundo pode contribuir elevando a produção dos gases pela pecuária (Elghandour et al., 2019).

Estratégias de mitigação, como a manipulação dietética e o uso de extratos vegetais, ácidos orgânicos, reagentes químicos e de leveduras são alguns dos métodos de redução da emissão de gases do efeito estufa em ruminantes, já que alteram as características fermentativas ruminais (Haque, 2018).

A utilização de leveduras em ruminantes como meio de mitigação já foi descrita, porém existem poucos estudos com equinos. Em um estudo com cavalos, Elghandour et al. (2016) observaram que a utilização de leveduras reduziu a produção de metano *in vitro* em até 84,9%, além de aumentar a digestibilidade de alguns alimentos, nas doses de 2,0 e 4,0 mg/g de matéria seca incubada.

Neste sentido, Elghandour et al. (2014) e Salem et al. (2016), em estudos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, observaram que a adição de leveduras na dieta de equinos melhorou a digestão de forragens de baixa qualidade; e Morgan et al. (2007) notaram aumento dos coeficientes de digestibilidade da proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) em dietas com feno de

baixa qualidade, com um aumento de 5,55 e 5,3%, respectivamente.

Como a utilização de leveduras para mitigação de gases do efeito estufa em equinos é uma nova área de interesse em desenvolvimento, ainda há escassez de informações sobre possíveis estratégias de uso, bem como dos demais impactos benéficos de sua utilização para tal fim. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da adição de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a taxa de produção de gases totais e a degradabilidade *in vitro* da matéria seca, a partir da utilização inóculo fecal de equinos alimentados com feno de Tifton 85.

## Material e Métodos

### *Animais e localização do experimento*

Os animais utilizados no experimento foram alojados nas dependências do Haras Raio de Sol, localizado na zona rural do município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

Para obtenção do inóculo fecal foram utilizados quatro potros clinicamente saudáveis, da raça Campolina, com idade média de 2,6 anos, pesando em média 365 Kg. Os animais foram desverminados 72 horas antes do início do experimento, com antiparasitário de amplo espectro à base de Ivermectina associado a Pirantel, sendo posteriormente submetidos a um período de adaptação à dieta de 40 dias.

### *Manejo dos animais*

A dieta dos animais foi constituída de 100% de feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*), fracionada em duas refeições. Durante o período de adaptação foi fornecido sal mineral e água *ad libitum*. Os potros foram mantidos em baias de alvenaria de 30,65 m<sup>2</sup> com cama de areia, e foram soltos diariamente durante duas horas para se exercitarem livremente em pista de areia.

Para cálculo do fornecimento diário de feno, levando em consideração a ingestão de matéria seca de 2,5% do peso vivo, conforme recomendações do *Nutrient Requirement of Horse* (NRC, 2007), foi determinada a matéria seca (MS) do feno segundo AOAC (1990). Uma amostra representativa foi coletada de forma aleatória de vários pontos dos fardos de Tifton 85, as quais foram homogeneizadas para obtenção da amostra composta utilizada para a análise.

### Incubações *in vitro*

O conteúdo fecal (fonte de inóculo) foi coletado diretamente da ampola retal dos quatro potros, antes do fornecimento da refeição matinal. As fezes foram homogêneas em uma amostra composta e posteriormente 100 g do conteúdo foi processado junto a 900 mL de água destilada em liquidificador doméstico (ZAITEC® ZT-301), previamente aerado com gás carbônico para preparo do extrato segundo Lattimer et al. (2007).

Para avaliação da produção gasosa, foram coletadas, de forma aleatória, doze amostras do feno de Tifton 85 obtidas dos fardos que foram utilizados na alimentação dos animais. As amostras foram processadas em moinho do tipo Willey com peneiras de crivo de 2 mm. Posteriormente, amostras de 1 g do feno foram acondicionadas em frascos de fermentação com capacidade de 160 mL, previamente aerados com gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e com posterior adição de 90 mL de meio de cultura elaborado segundo Theodorou et al. (1994).

Nos tratamentos com a utilização de levedura, foram adicionados 5 mg/g de levedura pura (*Saccharomyces cerevisiae*) do produto Saf-instant®. Frascos sem substratos (amostra de Tifton 85) e leveduras, denominados brancos, contendo apenas inóculo e meio de cultura, foram também incubados para correção dos gases e desconto de eventuais contaminações provenientes da fermentação do inóculo. Foram utilizados três frascos (réplicas) por tratamento.

Após a inoculação, os frascos foram vedados com rolha de silicone e mantidos em estufa a 39 °C por 96 horas. A produção cumulativa de gases foi estimada por meio da mensuração da pressão dos gases produzidos no decorrer do processo fermentativo, utilizando-se transdutor de pressão (LOGGER AG 100 – Agricer) nos tempos de 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas.

Ao final do período de incubação, foi determinada a degradabilidade *in vitro* da matéria seca. Os frascos foram refrigerados para interrupção da fermentação, com posterior filtragem do conteúdo dos frascos em cadinhos de borossilicato com porosidade I. Os cadinhos foram mantidos por 48 horas em estufa de 105 °C, sendo posteriormente pesados. O peso foi utilizado para o cálculo de degradabilidade da matéria seca.

### Análise bromatológica

Para análise bromatológica foram utilizadas as mesmas amostras de feno que foram usadas como substrato no processo de fermentação. A

análise químico-bromatológica desse material foi realizada para determinação de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), segundo Detmann (2012); fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina, de acordo com Van Soest et al. (1991).

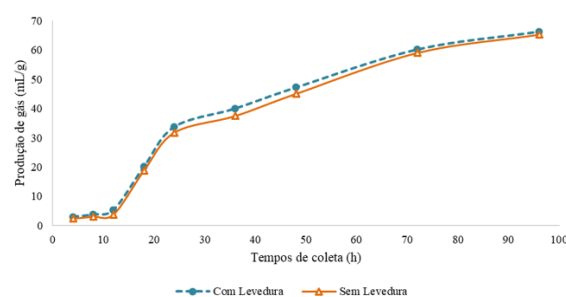
Todas as amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), localizado no prédio do CENLAG, da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE).

### Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema de parcelas subdivididas. As parcelas (tratamentos) foram constituídas pela adição ou não (controle) de 5 mg de *Saccharomyces cerevisiae*, e as subparcelas compostas pelos tempos de avaliação da produção de gases (4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas), com sete repetições por tratamento (amostras de feno). Com bases nos dados de produção de gases foram obtidas equações de regressão que foram comparadas pelos testes de paralelismo e identidade de curvas.

### Resultados e Discussão

Não houve diferença entre os tratamentos na produção total de gás conforme demonstrado na Figura 1. Entretanto, a fase de latência, ou fase *lag*, do tratamento sem levedura teve uma duração de 17,49 horas e no tratamento com levedura de 14,44 horas. Apesar de não ter apresentado diferença, pode-se perceber que houve uma tendência para redução da fase *lag* no tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 1.** Produção total de gás (mL/g) em diferentes tempos de incubação e inclusão de *Saccharomyces cerevisiae*.

Resultado semelhante foi encontrado por Elghandour et al. (2014), em estudo com adição de

*Saccharomyces cerevisiae* em sistemas fermentativos com inóculo fecal equino utilizando nove espécies forrageiras. Os autores observaram que a fase *lag* foi menor, quando comparado ao controle, que não possuía nenhuma inclusão de levedura.

A fase *lag* é uma mensuração relacionada ao tempo necessário para que os microrganismos do intestino iniciem a digestão do alimento. Vale ressaltar que a digestibilidade é um indicador de adaptabilidade dos microrganismos à digesta e ao ambiente (Velazquéz et al., 2019). Os resultados do presente estudo evidenciaram que a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* pode tornar o ambiente intestinal favorável para os microrganismos, acelerando o início da digestão e propiciando melhor aproveitamento do alimento. Wallace (1994) ainda afirmam que em ruminantes as leveduras possuem capacidade de fornecer nutrientes e remover o oxigênio adsorvido nas partículas de alimentos, estimulando o crescimento de bactérias anaeróbicas, principalmente as celulolíticas, além de fungos e protozoários

ciliados, favorecendo o processo fermentativo. Em equinos, essa ação ocorre a nível intestinal, principalmente em relação ao crescimento de bactérias anaeróbicas (Palagi et al., 2017).

A fase logarítmica, ou fase *log*, também não apresentou diferença entre os tratamentos, estendendo-se até as 96 horas nos tratamentos sem e com levedura, com produção total de 67,52 e 68,98 mL/g de MS de gás, respectivamente. A curva de produção de gases não entrou em platô, o que sugere maior população de microrganismos celulolíticos. Este fato pode estar relacionado à adaptação da microbiota intestinal dos equinos utilizados no presente estudo, pois estes foram submetidos a um período de adaptação à dieta experimental de 40 dias.

Em relação à cinética de fermentação, não houve diferença entre os tratamentos conforme observado na Tabela 1. De acordo com Elghandour et al. (2016), a resposta dos alimentos à adição de levedura depende de muitos fatores, incluindo a fonte de levedura, tipo e composição de alimento, método de aplicação e nível de adição da levedura.

**Tabela 1.** Parâmetros obtidos através da cinética de fermentação.

	A (mL)	B (%/h)	C (h)	D (mL)	E (%/h)	Prod. gás (mL/g de MS)	Deg. <i>in vitro</i> da MS (%)
<b>S/levedura</b>	42,98	0,016	17,4951	24,54	1,089	67,90	33,6950
<b>C/levedura</b>	42,57	0,015	14,4400	26,13	0,150	68,98	33,3168

A: volume de gases produzido pela degradação da fração A+B1 do Sistema de Cornell (CNF); B: taxa específica de produção de gases pela degradação da fração de carboidratos não fibrosos; C: *lag time* ou fase de latência; D: volume de gases produzido pela degradação da fração B2 do Sistema de Cornell (CF); E: taxa específica de produção de gases pela degradação da fração de carboidratos fibrosos. Prod.: produção; Deg.: Degradabilidade.

Trabalhos realizados por Salem et al. (2016) mostraram que houve maior produção de gás em éguas que receberam leveduras, via oral, na dose de 11 g/animal/dia, apresentando maior digestibilidade dos nutrientes, permitindo maior consumo voluntário e, conseqüentemente, diminuição do preenchimento do ceco. O que difere deste trabalho, no qual as leveduras foram adicionadas diretamente ao inóculo fecal.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que cerca de 80-90% da parede celular das leveduras são compostos por carboidratos, principalmente betaglucanos e mananos e, desta forma, quando são adicionadas em baixas concentrações, podem ser fermentadas pela microbiota ao invés de estimulá-la (Taran et al., 2016). Isso pode justificar a ausência de diferença entre os dois tratamentos na cinética de produção de gás do presente trabalho, tendo em

vista que foi utilizado apenas 5 mg de levedura adicionadas ao inóculo.

Ademais, no presente estudo outros parâmetros não avaliados podem ter sido significativos, como a indução de mudanças qualitativas na produção de gases, podendo apresentar diminuição da produção de metano, por exemplo.

Em relação à degradabilidade *in vitro* da matéria seca, também não foi observada diferença entre os tratamentos conforme observado na Tabela 1. Alguns trabalhos relataram que o uso de leveduras pode aumentar a digestão e a cinética de fermentação de alguns alimentos. Entretanto, Lattimer et al. (2007) em estudo *in vitro* com a adição de *Saccharomyces cerevisiae* em dietas experimentais utilizando incubadora *in vitro* Daisy II, observaram que a suplementação de leveduras não apresentou efeito. Os autores acreditam que por ser um sistema fermentativo fechado, ou seja,



sem fluxo contínuo de nutrientes e bactérias, a incubadora não permitiu avaliação do efeito da levedura sob a microbiota do inóculo, principalmente sob as bactérias celulolíticas, que podem não ter conseguido aumentar sua concentração no meio, devido a uma quantidade limitada de substrato no sistema.

Elghandour et al. (2016) verificaram que a suplementação com leveduras propiciou maior fermentação em dietas contendo concentrado, quando comparadas a dietas compostas apenas por volumoso. Ademais, Morgan et al. (2007) em estudo *in vivo* objetivando avaliar o efeito da suplementação de leveduras na digestibilidade de volumosos de alta e baixa qualidade em cavalos, observaram aumento dos coeficientes de digestibilidade da proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) apenas nas dietas com feno de baixa qualidade, com aumento de 47,50 para 53,05% e de 25,10 para 30,40%, respectivamente.

O estudo supracitado sugeriu maior atividade das leveduras na digestão de alimentos com uma qualidade nutricional menor, podendo justificar assim a baixa eficiência encontrada no presente estudo, tendo em vista que o feno utilizado apresentava boa qualidade nutricional (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição bromatológica do feno de Tifton 85.

Nutriente	g/kg de Matéria seca
MS	933,76±7,07
MM	85,92±8,45
MO	914,08±8,45
FDA	478,71±8,82
LDA	102,07±5,51
FDN	786,06±9,81
EE	10,43±1,34
PB	96,94±4,10

### Conclusão

A adição de 5 mg/g de *Saccharomyces cerevisiae* diretamente ao inóculo fecal não tem efeito sobre a taxa de produção de gases totais e degradabilidade *in vitro* da matéria seca de Tifton 85.

### Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses. As instituições patrocinadoras não tiveram nenhum papel no desenho, coleta, análise ou interpretação dos dados do estudo, tampouco na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

### Comitê de Ética e Biossegurança

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob número: 019/2016.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq); A Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE-UAG); Ao Laboratório de Nutrição Animal (LANA); ao Haras Raio de Sol e a todos aqueles que nos ajudaram na realização desse trabalho.

### Referências

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15<sup>th</sup> ed. Washington: AOAC, 1990.
- Detmann, E.; Souza, M.A.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Berchielli, T.T.; Saliba, E.O.S.; Cabral, L.S.; Pina, D.S.; Ladeira, M.M.; Azevedo, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**. INCT - Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 171p.
- Elghandour, M.M.M.Y.; Chagoyán, J.C.V.; Salem A.Z.M.; Kholif, A.E.; Castañeda, J.S.M.; Camacho, L.M.; Buendía, G. *In vitro* fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Equine Veterinary Science**, 34: 619-625, 2014.
- Elghandour, M.M.M.Y.; Kholif, A.E.; Lopez, S.; Mendoza, G.D.; Odongo, N.; Salem, A.Z. M. *In vitro* gas, methane, and carbon dioxide production of high fibrous diets incubated with fecal inocula from horses in response to the supplementation with different live yeast additives. **Journal of Equine Veterinary Science**, 38: 67-71, 2016.
- Elghandour, M.M.M.Y.; Adegbeye, M.J.; Barbabosa-pilego, A.; Perez, N.R.; Hernández, S. R.; Zaragoza-bastida, A.; Salem, A.Z.M. Equine contribution in methane emission and its mitigation strategies. **Journal of Equine Veterinary Science**, 72: 56-63, 2019.
- Haque, M.N. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. **Journal of Animal Science and Technology**, 60: 1-10, 2018.

- Hristov, A.N.; Oh, J.; Firkins, J.L.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Makkar, H.P.S.; Adesogan, A.T.; Yang, W.; Lee, C.; Gerber, P.J.; Henderson, B.; Tricarico, J.M. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, 91: 5045-5069, 2013.
- Knapp, J.R.; Laur, G.L.; Vadas, P.A.; Weiss, W.P.; Tricarico, J.M. Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, 97: 3231-3261, 2014.
- Lattimer, J.M.; Cooper, S.R.; Freeman, D.W.; Lalman, D.L. Effect of yeast culture on *in vitro* fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. **Journal of Animal Science**, 85: 2484-2491, 2007.
- Machado, F.S.; Pereira, L.G.R.; Guimarães Junior, R.; Lopes, F.C.F.; Chaves, A.V.; Campos, M.M.; Morenz, M.J.F. **Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação**. Juiz de Fora - MG: Embrapa Gado de Leite, 2011. 92p.
- Morgan, L.M.; Coverdale, J.A.; Froetschel, M.A.; Yoon, I. Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, 27(6): 260-265, 2007.
- NCR. National Research Council. **Nutrient Requirements of Horses**. 6<sup>a</sup> ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007. 341p.
- Palagi, M.A.F.; Feltre, K.; Gonzaga, I.V.F.; Costa, R.L.; Moraes Filho, J.M.; Balieiro, J.C.C.; Gobesso, A.A.O. Supplementation with live yeasts and essential oils does not alter blood, fecal and digestible parameters in horses. **Livestock Science**, 206: 161-165, 2017.
- Salem, A.Z.M.; Elghandour, M.M.Y.; Kholif, A.E.; Barbabosa, A.; Camacho, L.M.; Odongo, N.E. The effect of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count and *in vitro* fecal fermentation. **Journal of Equine Veterinary Science**, 39: 12-19, 2016.
- Taran, F.M.P.; Gobesso, A.A.O.; Gonzaga, I.V.F.; Franço, R.; Centini, T.N.; Moreira, C.G.; Silva, L.F.P. Effects of different amounts of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on apparent digestibility and faecal parameters in horses fed high-roughage and high-concentrate diets. 186, 29-33, 2016.
- Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; McAllen, A.B.; France, J.A. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, 48(3): 185-197, 1994.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, 74(10): 3583-3597, 1991.
- Velázquez, A.E.; Elghandour, M.M.M.Y.; Adegbeye, M.J.; Pilego, A.B.; Vallejo, L.H.; Abdelfattah Z.M.; Salem, A.Z.M.; Salazar, M.C. Influence of dietary inclusion with corn and soybean oils, in combination with live yeast culture, on horse fecal methane, carbon dioxide and hydrogen production. **Journal of Equine Veterinary Science**, 74: 42-50, 2019.
- Wallace, J. Ruminant microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, 72: 1992, 1994.