









Medición de la producción de gas *in vitro* y contenido de energía metabolizable de alimentos para ruminantes incubados con excretas de ovinos

Sebastián Sáenz Barrera , Nydia C. Vásquez Aguilar¹ , Hugo Bernal Barragán ,
Humberto González Rodríguez² , Oscar D. García Pérez³ , Arquímedes Cruz López⁴ 

Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Measurement of *in vitro* gas production and metabolizable energy content of feed for ruminants incubated with sheep excreta

Abstract. An experiment was performed to measure the *in vitro* gas production at 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 h of incubation with two types of inocula collected from two Saint Croix sheep (T1: ruminal liquid, T2: excreta with yeast) in five diets for ruminants with different concentrate (C) and forage (F) ratios (100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F y 0C:100F). The aim was to evaluate the feasibility of utilizing excreta instead of ruminal liquid as inoculum in the *in vitro* gas production (PGIV) technique, to determine the *in vitro* digestibility of organic matter (DIVMO) and metabolizable energy content (EM) in diets for ruminants. The PGIV obtained with ruminal liquid was higher ($P < 0.05$), than that with excreta + yeast as inoculum in each evaluated diet. However, utilizing simple linear, or polynomial regression approach or correction factors developed in this research, similar results for PGIV, DIVMO and EM for ruminal liquid were estimated from gas production obtained using excreta with yeast as an alternative inoculum.

Keywords: ruminal liquid, excreta, inoculum, gas production.

Resumen. Se realizó un experimento para medir la producción de gas *in vitro* a 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h de incubación, con dos inóculos colectados de dos ovinos Saint Croix (T1: líquido ruminal, T2: excretas con levadura), en cinco dietas para ruminantes con diferentes proporciones de concentrado (C) y forraje (F), (100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F y 0C:100F). El objetivo fue evaluar la factibilidad de utilizar excretas, en sustitución del líquido ruminal, como inóculo en la técnica de producción de gas *in vitro* (PGIV), para determinar la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) y el contenido de energía metabolizable (EM) de dietas para ruminantes. La PGIV registrada con líquido ruminal fue mayor ($P < 0.05$), a la obtenida utilizando excretas con levadura como inóculo en cada dieta evaluada. Sin embargo, utilizando modelos de regresión lineal simple, polinómica y factores de corrección, desarrollados en esta investigación, fue posible estimar resultados similares de PGIV, DIVMO y EM obtenidos con líquido ruminal, a partir de la producción de gas registrada con excretas con levadura como inóculo.

Palabras clave: líquido ruminal, excreta, inóculo, producción de gas.

Medição da produção de gás *in vitro* e conteúdo de energia metabolizável de alimentos para ruminantes incubados com excrementos de ovinos

Resumo. Foi realizado um experimento para medir a produção de gás *in vitro* em 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 h de incubação, com dois inóculos coletados de duas ovelhas Saint Croix (T1: líquido ruminal, T2: excreta com levedura), em cinco dietas para ruminantes com diferentes proporções de concentrado (C) e forragem (F), (100C:0F, 75C:25F, 50C:50F, 25C:75F e 0C:100F). O objetivo foi avaliar a viabilidade do uso de excretas, em substituição ao fluido ruminal, como

¹ Autor para la correspondencia: nydia.vasquezag@uanl.edu.mx

² Facultad de Ciencias Forestales.

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

⁴ Facultad de Ingeniería Civil.

inóculo na técnica de produção de gás *in vitro* (PGIV), para determinar a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e o conteúdo de energia metabolizável (EM) de dietas para ruminantes. O PGIV registrado com fluido ruminal foi maior ($P < 0,05$) do que aquele obtido utilizando excreta com levedura como inóculo em cada dieta avaliada. Entretanto, utilizando modelos de regressão linear simples, polinomiais e fatores de correção, desenvolvidos nesta pesquisa, foi possível estimar resultados semelhantes de PGIV, DIVMO e EM obtidos com fluido ruminal, a partir da produção de gás registrada com excreta com levedura como inóculo.

Palavras-chave: líquido ruminal, excreta, inóculo, produção de gás.

Introducción

El valor nutricional de los alimentos para rumiantes está determinado por las concentraciones de sus nutrientes, así como por su grado de digestión y utilización (Hamid et al., 2007). La producción de gas *in vitro* (PGIV, principalmente CO₂ y CH₄), obtenida a partir de la incubación de los alimentos en inóculo de líquido ruminal y saliva artificial permite determinar la digestibilidad del alimento (Getachew et al., 2002), la cinética de fermentación (Storm et al., 2012) y estimar el contenido de energía de las dietas (Anele et al., 2011). Para los casos en que no se pudiera disponer de animales fistulados como donantes de líquido ruminal, se ha propuesto utilizar heces frescas como inóculo (Váradyová et al., 2005). Sin embargo, resultados obtenidos de su potencial en la técnica de producción de gas en algunos estudios (Cone et al., 2002; Posada et al., 2012), han sido contrastantes. Dado que en la mayoría de los casos, el

líquido ruminal presenta mayor fermentación del alimento, se ha sugerido enriquecer la actividad microbiana en las excretas mediante el uso de ciertos aditivos. Según Dawson et al., (1990), la levadura inactivada proporciona factores estimulantes para el crecimiento de las bacterias del rumen, al ser una fuente de vitaminas, enzimas y cofactores, lo que ayudó a mejorar la producción de gas y la estimación de la digestibilidad *in vitro* (Opsit et al., 2012). La sustitución del líquido ruminal por excretas enriquecidas con levadura inactivada como inóculo pudiera ser benéfico también en aspectos de bienestar animal, éticos, productivos y sanitarios (Manteca, 2012). El objetivo del presente estudio fue determinar si las excretas enriquecidas con levadura inactivada pueden sustituir al líquido ruminal como inóculo en incubaciones de alimentos *in vitro* para rumiantes y en la determinación de su valor nutricional.

Materiales y Métodos

Manejo y alimentación de animales donadores del inóculo

El uso de los animales para investigación fue aprobado por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL (Dictamen No.015/2021 Folio: 006.2021). Dos ovinos Saint Croix de 3 años de edad, (fistulados a la edad de 6 meses), fueron cuidados atendiendo las disposiciones emitidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y utilizados como donadores del inóculo ruminal y excretas. Para el presente estudio, los ovinos fueron alimentados con 1.3 kg/día/animal de una dieta con 14% de proteína y 2.25 Mcal EM/kg, a base de 60% heno, 15% heno de alfalfa y 25% de concentrado, y agua a libre acceso.

Medición de la producción de gas *in vitro*

Se utilizó líquido ruminal o excretas con levadura como inóculo para llevar a cabo tres incubaciones ($n = 3$), en duplicado, para cada uno de cinco dietas experimentales elaborados con las siguientes proporciones de concentrado (C) y forraje (F): 100C:0F; 75C:25F; 50C:50F; 25C:75F; 0C:100F. El concentrado (C) fue elaborado con 58% de grano de sorgo y 42% harina de

soya, y el forraje (F) consistió en una mezcla 50% pasto bermuda y 50% de pasto Johnson. La composición química de las cinco dietas se determinó por duplicado (AOAC, 2005).

Excretas frescas fueron obtenidas directamente del recto de ovejas en el día previo a la incubación, en un termo precalentado y purgado con CO₂ a temperatura de 39 ± 0.5 °C, que fueron homogenizadas y purgadas con CO₂. Veinte g de heces se diluyeron en 120 ml de solución tampón (Aiple et al., 1992), y se adicionaron cinco g de levadura inactivada de *Sacharomyces cerevisiae* (PlassYeast, Plasset Ingredients, México), y esta solución se mantuvo a 39 °C durante 24 horas. Inmediatamente antes de la incubación, las excretas con levadura se filtraron a través de cuatro capas de gasa y este filtrado fue utilizado como inóculo (Posada et al., 2012).

El líquido ruminal fue colectado el día de la incubación, antes de la alimentación matutina, por la fistula ruminal, utilizando una bomba de vacío operada manualmente, y fue transferido al laboratorio en un termo precalentado a 39 ± 0.5 °C, purgado con CO₂ y filtrado a través de 4 capas de gasa. Muestras de 200 mg de cada dieta, molidas y cribadas a 1 mm, fueron incubadas en 30 ml de una mezcla 2:1 (v/v) de saliva artificial con el inóculo correspon-

diente, en jeringas de incubación de 100 ml (Fortuna®, Häberle Labortechnik, Alemania) graduadas a división mínima de 1 ml (Menke y Steingass, 1988; Váradyová et al., 2005). La saliva artificial fue elaborada con una solución buffer a base de bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio y solución nutritiva (Melesse et al., 2017). Las muestras se incubaron a 39 °C y se midió la producción de gas a 3, 6, 9, 12, 24, 36, y 48 h, se utilizaron los datos crudos de producción de gas sin ajuste de la curva de producción de gas por modelos clásicos comúnmente utilizados (Cabral et al., 2019), para evitar distorsión de la producción de gas obtenida al evaluar un inóculo no estándar (excreta con levadura) dentro de la técnica de producción de gas *in vitro*. La producción de gas solo fue corregida por un blanco que consistía en el inóculo sin muestra. Además, se normalizó la producción de gas entre incubaciones, utilizando alfalfa como forraje estándar de referencia.

Modelos de predicción para obtener PGIV y estimar contenido de energía metabolizable y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

A partir de la PGIV a 24 horas de incubación con inóculo

basado en excretas adicionadas con levadura, se estimó mediante regresión lineal simple (RLS), regresión polinómica (RPOL) y un factor de corrección (FC) la PGIV de las 5 dietas experimentales incubadas utilizando el líquido ruminal como inóculo.

El contenido de energía metabolizable (EM) para muestras de forraje y concentrado y la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) de las distintas dietas fueron estimados utilizando las ecuaciones propuestas por Menke y Steingass (1988).

Análisis estadístico

Los valores de PGIV, EM, DIVMO, obtenidos a partir de la incubación de las dietas experimentales, se analizaron mediante un ANOVA, con arreglo factorial de tratamientos 2 x 5, con dos inóculos (líquido ruminal y excretas con levadura) en cinco dietas con diferentes proporciones de C: F, con n=3 repeticiones, y con observaciones en duplicado por repetición. Diferencias entre tratamientos fueron determinados con la prueba de Tukey, a un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS® Statistics versión 21.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los análisis en las dietas experimentales utilizadas en las incubaciones para determinar el efecto del tipo de inóculo (líquido

ruminal o excretas más levadura) sobre PGIV, DIVMO, y contenido de EM.

Tabla 1. Composición química de las dietas evaluadas.

Parámetro (base MS)	Dieta				
	100C:0F	75C:25F	50C:50F	25C:75F	0C:100F
Proteína Cruda (%)	28.06	24.78	18.25	15.63	10.28
Extracto Etéreo (%)	2.74	2.08	1.75	1.68	1.39
Fibra Detergente Neutro (%)	13.79	29.83	43.47	56.29	67.94
Fibra Detergente Ácida (%)	4.17	15.05	23.94	33.24	42.74
Lignina Ácido Detergente (%)	0.09	0.70	1.23	1.31	1.64
Hemicelulosa (%)	9.63	14.77	19.53	23.05	25.20
Celulosa (%)	4.07	14.35	22.70	25.20	41.10
Cenizas (%)	4.77	6.89	7.97	9.64	11.03

La cantidad de gas producido *in vitro* con los dos inóculos evaluados, fue mayor ($P < 0.05$) en dietas con mayor proporción de concentrado (Figura 1), lo cual era esperable y concuerda con lo reportado por Arbabi et al., (2017). Según Melesse et al., (2017), existe una alta correlación positiva entre el contenido de energía y el valor de producción de gas en pastos tropicales. Para los tiempos de incubación hasta 48 horas, la PGIV obtenida con líquido ruminal fue mayor ($P < 0.05$), a la registrada con inóculo de excreta con levadura (Figura 1). Estudios previos reportaron que la producción de gas y metano resultó menor al utilizar inóculo fecal (Ramin et al., 2015),

y que al incubar distintos alimentos, en jeringas de vidrio o transductores de presión, utilizando excretas como inóculo, se registró menor producción de gas que al utilizar líquido ruminal de ovejas Merino Váradyová et al., (2005). Esto sugiere que la población y actividad de bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas y amilolíticas es mayor en el líquido ruminal que en las excretas, debido quizá a diferencias en concentraciones de filos tales como cianobacterias, fibrobacter, lentsiferas, tenericutes, espiroquetas, firmicutes y bacteroidetes (Jeferson et al., 2020), además de un ambiente más adecuado de pH, humedad y osmolaridad (Geron et al., 2019).

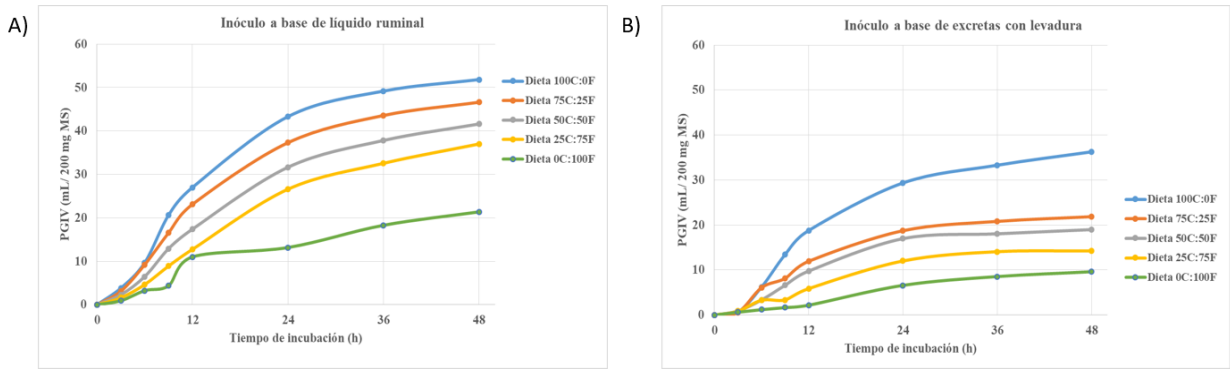


Figura 1. PGIV a 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h de incubación en dietas con diferentes proporciones de concentrado (C) y forraje (F). A) Inóculo de líquido ruminal. B) Inóculo de excretas con levadura.

En el presente estudio, la levadura inactivada adicionada a las excretas no tuvo efecto suficiente en la actividad de bacterias, para que la producción de gas registrada con este inóculo fuera similar a la obtenida con el líquido ruminal (Figura 1).

Tabla 2. Modelos predictivos de PGIV de líquido ruminal (y) a partir de PGIV de excretas con levadura (x).

Modelo predictivo	Tipo de alimento	Ecuación	R ²
RLS	Concentrado	y = -0.7229x + 64.469	0.8855
	Forraje	y = 1.4325x + 8.2066	0.6370
RPOL	Concentrado	y = -0.0116x ² - 0.0256x + 54.092	0.8869
	Forraje	y = -0.1007x ² + 4.1297x - 7.0926	0.7216
FC	Concentrado	y = 1.322x	-
	Forraje	y = 1.4955x	-

RLS: Regresión Lineal Simple, RPOL: Regresión Polinómica, FC: Factor de Corrección.

Posiblemente una concentración y población de microorganismos en las excretas menor que en el líquido ruminal (Mamun *et al.*, 2020), sea el principal factor limitante para que los componentes nutricionales y de cofactores de la levadura inactivada, como proteínas, polisacáridos (principalmente β-glucanos y manano-oligosacáridos), péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos y antioxidantes (Alugongo *et al.*, 2017), puedan incrementar la cantidad de gas producido con este inóculo. A partir de valores de PGIV a las 24 horas, obtenidos utilizando el inóculo de excretas con levadura, se establecieron ecuaciones de regresión lineal simple (RLS) (Posada *et al.*, 2012), regresión polinómica (RPOL) de segundo grado (Geron *et al.*, 2019) y factores de corrección (FC), que permitieron estimar los valores equivalentes de PGIV registrados al utilizar líquido ruminal como inóculo (Tabla 2). La mejor estimación (P<0.05), se obtuvo utilizando la ecuación RPOL de segundo grado para

concentrados (R²=0.8869) y forrajes (R²=0.7216). Los resultados estimados con FC fueron diferentes (P<0.05) a los esperados, por lo que se consideró que esta opción fue la menos conveniente. La estimación obtenida con RLS (R²=0.637) para forrajes y (R²=0.8855) en concentrados resultó ser de calidad intermedia, comparada con los valores originales de PGIV obtenidos con líquido ruminal como valores de referencia. A partir de la producción de gas de las excretas con levadura, fue posible calcular el contenido de EM y la DIVMO (Tabla 3), concordando con lo reportado por El-Meadaway *et al.*, (1998). La precisión en la estimación de los parámetros EM y DIVMO utilizando las ecuaciones de predicción RLS y RPOL se mantiene estable en las diferentes dietas evaluadas. Sin embargo, cuando se utilizó el Factor de Corrección (FC), la precisión de la estimación disminuyó a partir de la dieta 75C:25F, con las dietas que contenían mayor proporción de forraje.

Tabla 3. Estimación del contenido de Energía Metabolizable (EM, Mcal/kg) y Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO, %) de dietas con cinco proporciones de concentrado (C) y forraje (F) mediante ecuaciones de predicción (RLS, RPOL, FC) en base a la relación de producción de gas al utilizar excretas con levadura y líquido ruminal en la PGIV a las 24 h.

Dieta	Parámetro	Líquido Ruminal	RLS	RPOL	FC	EEM	Valor P
100C:0F	EM	2.493	2.493	2.491	2.322	0.053	0.084
	DIVMO	69.04	69.04	69.01	64.99	1.309	0.100
75C:25F	EM	2.088 ^a	2.005 ^a	1.962 ^{ab}	1.750 ^b	0.062	0.007
	DIVMO	63.61 ^a	61.58 ^a	60.52 ^{ab}	55.33 ^b	1.516	0.007
50C:50F	EM	1.775 ^a	1.804 ^a	1.845 ^a	1.554 ^b	0.034	0.001
	DIVMO	56.37 ^a	57.12 ^a	58.15 ^a	50.77 ^b	0.860	0.001
25C:75F	EM	1.570 ^a	1.513 ^a	1.590 ^a	1.261 ^b	0.049	0.001
	DIVMO	51.80 ^a	50.28 ^a	52.31 ^a	43.64 ^b	1.315	0.001
0C:100F	EM	1.103 ^{ab}	1.226 ^a	1.137 ^{ab}	0.971 ^b	0.043	0.006
	DIVMO	38.66 ^{ab}	42.01 ^a	39.59 ^{ab}	35.06 ^b	1.141	0.005

RLS: Regresión lineal simple, RPOL: Regresión polinómica, FC: Factor de corrección. EEM: Error estándar medio

Conclusiones

En el presente estudio se demuestra la factibilidad de utilizar excretas adicionadas con levadura inactivada, como inóculo para la técnica de producción de gas *in vitro*, con el fin de estimar la energía metabolizable y la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica de dietas con proporciones contrastantes de concentrado y forraje, utilizando la ecuación de la regresión polinómica generada en el pre-

sente estudio. De esta manera, se concluye que es posible sustituir con excretas adicionadas con levadura, el inóculo líquido ruminal, obtenido a partir de animales fistulados, y con ello reducir el uso de este tipo de animales como donadores de inóculo para medir la producción de gas *in vitro*

Agradecimientos

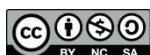
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca otorgada a SSB para la realización de sus estudios de Maestría en Ciencia Animal. Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y

Tecnológica (PAICYT) de la UANL. Al Posgrado Conjunto en Ciencia Animal de Facultad de Agronomía y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Literatura Citada

- Aiple, K. P., H. Steingass, K.-H. Menke. 1992. Suitability of a buffered faecal suspension as the inoculum in the Hohenheim gas test. *J. Physiol. Anim. Nutr.* 67:57–66.
- Alugongo, G. M., Xiao, J., Wu, Z., Li, S., Wang, Y., & Cao, Z. 2017. Review: Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8:1–12.
- Anele, U. Y., K. H. Südekum, J. Hummel, O. M. Arigbede, A. O. Oni, J. A. Olanite, C. Böttger, V. O. Ojo, A. O. Jolaosho. 2011. Chemical characterization, *in vitro* dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) haulm varieties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 163:161–169.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A.
- Arbabi, S., T. Ghoorchi, S. Ramzanpour. 2017. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate the nutritive value of five forage to concentrate ratios. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 7:249–257.
- Cabral I. S., J. A. Gomes Azevêdo, D. S. Pina, L. G. Ribeiro Pereira, H. J. Fernandes, F. Moreira de Almida, L. L. Souza, R. F. de Lima, L. G. Alves Cirne. 2019. Evaluation of models utilized in *in vitro* gas production from tropical feedstuffs. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 40 (1):443–456.
- Cone, J. W., A. H. Van Gelder, H. Bachmann. 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.* 99:221–231.



- Dawson, K. A., K. E. Newman, J. A. Boling. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science*. 68: 3392-3398.
- El-Meadaway, A., Z. Mir, P. S. Mir, M. S. Zaman, L. J. Yanke. 1998. Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining *in vitro* digestibility and gas production. *Can. J. Anim. Sci.* 78:673-679.
- Geron, L. J. V., L. E. C. Veloso, S. C. De Aguiar, A. L. De Souza, I. De Souza Santos, R. J. Trautmann-Machado, A. De Moura Zanine, R. F. Da Silva, D. De Jesus Ferreira, S. F. P. Zanin. 2019. *In vitro* fermentation of the rations containing *Morinda citrifolia* L. (Noni) using two types of inoculum. *Semin. Agrar.* 40:831-842.
- Getachew, G., G. M. Crovetto, M. Fondevila, U. Krishnamoorthy, B. Singh, M. Spanghero, H. Steingass, P. H. Robinson, M. M. Kailas. 2002. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102:169-180.
- Hamid, P., T. Akbar, J. Hossein, M. G. Ali. 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the *in vivo* and *in vitro* gas production techniques. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 2:108-113.
- Jeferson, L. M., T. J. Kieran, D. S. Seidel, T. C. Glenn, F. Magali, T. R. Callaway, R. L. Stewart. 2020. Comparison of the ruminal and fecal microbiotas in beef calves supplemented or not with concentrate. *PLoS ONE*, 15:1-17.
- Mamun, M. A. A., M. Sandeman, P. Rayment, P. Brook-Carter, E. Scholes, N. Kasinadhuni, D. Piedrafita, A. R. Greenhill. 2020. The composition and stability of the faecal microbiota of Merino sheep. *Journal of Applied Microbiology*, 128:280-291.
- Manteca, X. 2012. Capítulo VIII: Bienestar animal. *Red Porc. Iberoam.* 97-111.
- Melesse, A., H. Steingass, M. Schollenberger, M. Rodehutschord. 2017. Screening of common tropical grass and legume forages in Ethiopia for their nutrient composition and methane production profile *in vitro*. *Trop. Grasslands-Forrajes Trop.* 5:163-175.
- Menke, K.-H., H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28:7-55.
- NOM-062-ZOO-1999, 1999. Norma Oficial Mexicana, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- Opsi, F., R. Fortina, S. Tassone, R. Bodas, S. López. 2012. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different forage: concentrate ratio. *J. Agric.Sci.*150:271-283.
- Posada, S. L., R. R. Noguera, J. A. Segura. 2012. Ruminant feces used as inoculum for the *in vitro* gas production technique. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* 25:592-602.
- Ramin, M., D. Lerosé, F. Tagliapietra, P. Huhtanen. 2015. Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated *in vitro* gas production system. *Livest. Sci.* 181:65-71.
- Storm, I. M. L. D., A. Louise, F. Hellwing, N. I. Nielsen, J. Madsen. 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals*. 2:160-183.
- Váradyová, Z., M. Baran, I. Zelenák. 2005. Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124 Pa: 81-94.