

EFFECTO DE TANINOS CONDENSADOS EN EL POTENCIAL METANOGÉNICO Y EFICIENCIA DE DIGESTIÓN *IN VITRO* DE RAIGRÁS

Effect of condensed tannins in the methanogenic potential and in vitro digestion efficiency of ryegrass

Cantet, J.M.¹, Neumann Reiter, A.M.², Colombatto, D.³, Wawrzkiwicz, M.⁴ y Jaurena, G.⁵

Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA).

Instituto de Investigación de Producción Animal (INPA – CONICET – UBA)

RESUMEN

Los rumiantes son capaces de degradar y fermentar los componentes de la pared celular de forrajeras. En el retículo-rumen, la fermentación microbiana particiona la energía bruta del sustrato en ácidos grasos volátiles, biomasa microbiana (BM) y gases de desecho (e.g. metano, CH₄). Estos últimos son eliminados y representan, no solo contaminación ambiental por su efecto invernadero; sino también una pérdida de la energía disponible en el alimento. Numerosas especies vegetales poseen metabolitos secundarios, tales como los taninos condensados (TC), que, aunque tienen propiedades antimicrobianas y astringentes, su uso racional podría generar un mejor aprovechamiento de los forrajes con potenciales efectos mitigadores del CH₄ entérico. En este contexto, se evaluó el efecto de cuatro dosis de TC de Quebracho (*Schinopsis balansae*, 0, 1,5, 3,0 y 4,5 mg TC cada 100 mg de sustrato; correspondientes a los tratamientos Ctrl, TC1, TC2 y TC3) mediante la técnica de producción de gas *in vitro* (PGiv), en presencia o ausencia de polietilenglicol (inhibidor específico de los TC), para determinar el impacto en la fermentación ruminal del raigrás (*Lolium perenne*). La digestibilidad disminuyó en TC3, mientras que la PGiv aumentó asociada a las mayores tasas iniciales. No hubo efecto de los TC sobre la producción de CH₄, tampoco en la síntesis de BM. Por otro lado, el agregado de TC disminuyó la concentración de ácido propiónico, aumentado la relación acética: propiónico. Se concluye que los TC de Quebracho a las dosis estudiadas, no produjeron un efecto mitigador del CH₄, además de modificar los parámetros de fermentación, sobre todo con una inclusión de 4,5 mg de TC/100 mg de sustrato incubado.

Palabras clave: gases con efecto invernadero, polietilenglicol, rumiantes, compuestos antinutricionales, producción de gas *in vitro*.

SUMMARY

Ruminants are capable of degrading and fermenting the forage cell wall components. In reticulo-rumen, the microbial fermentation partition gross energy of the substrate into volatile fatty acids, microbial biomass (MB) and waste gases (e.g. methane, CH₄). These gases are eliminated and they represent, not only environmental pollution due to its greenhouse effect, but they also represent loss of the energy available in the forage. Numerous plant species have secondary compounds, such as condensed tannins (CT), although they have antimicrobial and astringent properties, their rational use could generate a better use of forages with potential mitigating effects of enteric CH₄. In this context, it was evaluated the effect of four doses of Quebracho (*Schinopsis balansae*, 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mg of CT per 100 mg of substrate, correspond to treatments Ctrl, TC1, TC2 and TC3) using the *in vitro* gas production technique (ivGP), in the presence or absence of polyethylene glycol (specific inhibitor of CT), to determine the impact on ruminal

Recibido: junio de 2018

Aceptado: mayo de 2019

¹ Méd. Vet., Dr. Becario Post-Doctoral CONICET, juanmcantet@gmail.com

² Ing. Agr. Tesista de grado, FAUBA, Av. San Martín 4453, C1417DSE, Bs As, Argentina, rneumann@agro.uba.ar

³ Ing. Agr., PhD. Investigador Adjunto (INPA-CONICET), Av. San Martín 4453, C1417DSE, Bs As, Argentina. Profesor Asociado, Cátedra de Producción de Bovinos de Carne, FAUBA, colombat@agro.uba.ar

⁴ Ing. Agr., Dra. Profesora Adjunta, Cátedra de Nutrición y Alimentación Animal, FAUBA, Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (CISNA), wawrzkie@agro.uba.ar

⁵ Ing. Agr. MSc, PhD. Profesor Asociado, Cátedra de Nutrición y Alimentación Animal, FAUBA, Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (CISNA), gjaurena@agro.uba.ar

fermentation of ryegrass (*Lolium perenne*). The digestibility decreased in TC3, while the ivGP increased associated with the higher initial rates. There was no effect of the CT on the CH₄ production, neither in the synthesis of MB. On the other hand, the addition of CT decreased propionic acid concentration, increasing the acetic: propionic ratio. It is concluded that the CT of Quebracho, at the doses studied, did not produce a CH₄ mitigating effect, in addition to modifying the fermentation parameters, especially with an inclusion of 4.5 mg of CT/ 100 mg of incubated substrate.

Key words: greenhouse gases, polietilenglicol, ruminants, anti-nutritional compounds, *in vitro* gas production.

Introducción

El rumen alberga poblaciones microbianas diversas que particionan la energía digestible de los alimentos para sintetizar biomasa microbiana (BM), ácidos grasos volátiles (AGV) y gases de desecho (CH₄, CO₂, H₂; McDonald et al., 2010). Esta partición puede ser evaluada *in vitro* gracias a la relación estequiométrica entre los perfiles de AGV y el gas producido a partir de la materia orgánica realmente digerida (Blümmel et al., 1997b), que permite estimar la producción de BM (Blümmel and Lebzien, 2001); generando así una caracterización más completa (comparando con la química húmeda y digestibilidad comúnmente utilizadas) de los alimentos para rumiantes.

La mayor producción de CH₄ (PCH₄) ruminal, es producto de la fermentación de carbohidratos fibrosos, por parte de *archaeas* metanogénicas, donde el aceptor final de los electrones de H⁺ es el C.

Si bien es lógico pensar que la eliminación de H⁺ y el direccionamiento de los C hacia CH₄ provocarían una disminución en el pH, esto ocurre en dietas ricas en almidón (Martin et al., 2010), pero no así en dietas fibrosas, donde la alta actividad metanogénica, si bien no está asociada a un descenso en el pH, generaría una ineficiencia en aprovechamiento de la fibra, con la consecuente reducción de la producción de BM, pudiendo representar una pérdida del 2 al 12% de la EB del alimento (Knapp et al., 2014).

Pero la PCH₄ no solo es importante como indicador de la ineficiencia con que son utilizados los alimentos, sino que también es un potente gas con efecto invernadero (GEI), siendo la producción animal, responsable de un 12 y 18% del total de las emisiones antropogénicas (FAOSTAT, 2014). Debido al creciente interés de la opinión pública de diversos países por la sustentabilidad del medio ambiente, existen en la actualidad, numerosos grupos de investigación comprometidos con la mitigación de GEI. Muchos de los cuales estudian factores nutricionales que mejoren las condiciones ambientales derivadas de la producción (e.g. mejoramiento de forrajes, uso de aditivos o componentes anti-nutricionales; Beauchemin et al., 2008).

Los taninos condensados (TC) son compuestos anti-nutricionales que sintetizan numerosas plantas como defensa contra la herbivoría (Lasa et al., 2010) y se utilizan en la industria del cuero, adhesivos y resinas, pero además presentan un potencial efecto mitigador de GEI, llegando a reducir hasta 26 % la PCH₄ (Grainger et al., 2009; Pathak et al., 2017). Esto se

puede atribuir directamente, por un efecto sobre la actividad de las *archaeas* metanogénicas o indirectamente, reduciendo la producción de H⁺ (Ortiz et al., 2014; Tavendale et al., 2005). Sin embargo, altas dosis, tanto como el tipo o naturaleza del extracto, podrían afectar la digestibilidad o síntesis de BM (Makkar, 2003).

En este trabajo se hipotetizó que la adición de TC afectará los patrones de fermentación de raigrás, utilizado como sustrato, generando una disminución en la PCH₄, con el consecuente aumento en la producción de AGV (o al menos con perfiles diferenciados) y/o BM. Para poner a prueba esta hipótesis, se planteó como objetivo determinar el efecto que produce la adición de diferentes dosis de TC sobre la digestibilidad y los parámetros fermentativos de raigrás (*Lolium perenne*) mediante la técnica de producción de gas *in vitro*.

Materiales y Métodos

Caracterización del experimento

El experimento se realizó en el Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (CISNA - FAUBA), donde se evaluó la fermentación de raigrás (*Lolium perenne*) sin aditivos (Ctrl) y con la adición de tres dosis de TC comercial de Quebracho (*Schinopsis balansae*, 1,5, 3,0 y 4,5 mg TC cada 100 mg de sustrato; TC1, TC2 y TC3 respectivamente), a través de la técnica de producción de gas *in vitro* (Theodorou et al., 1994). Todos los tratamientos fueron evaluados en presencia o ausencia de polietilenglicol (i.e. adicionando 1 ml de PEG o de agua destilada, P y N, respectivamente). El PEG se utilizó para evaluar el efecto particular de los TC, ya que tiene alta afinidad por los mismos (Makkar, 2000) sin generar efectos en la fermentación ni en la metanogénesis (Tavendale et al., 2005). El PEG se adicionó a razón de 20 mg por botella, asegurando 2 mg de PEG por mg de TC incluidos en cada botella.

Se evaluó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS, % MS), de la materia orgánica (ivDMO, % de MO) y de la fibra (DFDN como % de la FDN, y la FDN digestible en % MS, FDNd). Se midió la producción de gas acumulada neta (PGAN; ml/gr MS incubada) corregida por la producción de botellas blanco (i.e. sin sustrato), las tasas de producción de gas horarias (ml/h) y la PCH₄. Además, se evaluó el ambiente ruminal a partir del perfil de AGV, pH y la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃). Por último, se analizó la cantidad de sustrato degradado utilizado para producir BM, estimado por el factor de partición

(FP), que refleja la eficiencia de síntesis de BM (Blümmel et al., 1997a).

Análisis producto de la fermentación *in vitro*

Se utilizó licor ruminal de 2 ovejas fistuladas, con una dieta de mantenimiento (heno de alfalfa y de grano de maíz, relación 70: 30) como inóculo. Se utilizó como sustrato láminas de raigrás cosechadas en estado vegetativo molido en fresco. En breve, se colocaron las láminas en capas dentro de una caja de telgopor interponiendo pequeños trozos hielo seco (CO₂ presurizado), durante 3-5 minutos, hasta congelación. Luego fueron molidas con un molino industrial de acero inoxidable (Foss Tecator 2096 Homogeneizer) adicionando pequeños trozos de hielo seco dentro del molino, para mantener las propiedades quebradizas del forraje. El material molido (c.a. tamaño de partícula de c.a. 1 mm) se incubó (c.a. 0,200 g de MS) en botellas de vidrio color caramelo de 100 ml por duplicado en un baño termostático (i.e. 39°C en anaerobiosis durante 24 h). A cada botella se le agregó 38 ml de medio de incubación y 4 ml de licor ruminal (relación medio: licor, 10: 1). Se midió la presión (con un transductor de presión) y el volumen del gas de fermentación en 7 tiempos (i.e. 1, 2, 4, 8, 12, 16 y 24 h), con una jeringa calibrada, acumulando cada toma en viales de 20 ml saturados con N a presión atmosférica, para determinar la concentración de CH₄ en un cromatógrafo de gases HP 4890 series (Hewlett Packard® Labs, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una columna de acero inoxidable de 2 m de largo con N Porapak (malla de 80-100) y un detector FID (N como carrier, temperaturas: horno= 90°C, inyector= 110°C y FID= 250°C). Una vez obtenida la concentración de gases, la PCH₄ fue estimada de acuerdo con Lopez and Newbold (2007). En breve, se calculó el volumen de CH₄ según la siguiente fórmula:

$$\text{CH}_4 \text{ (ml)} = \text{PGA} + \text{HS} \times \text{Conc}$$

Donde PGA es el volumen (ml) del gas total producido; HS es el volumen (ml) del *headspace* en la botella y Conc es la proporción de CH₄ en la muestra.

Una vez conocido el volumen, la cantidad de CH₄ (en mMol) se puede calcular aplicando la fórmula de la ley de los gases ideales:

$$P \times V = n \times R \times T \approx (n = P \times V R \times T)$$

Donde n es la cantidad de CH₄ (en mMol), P es la presión atmosférica (en atmósferas), V el volumen del gas (en ml), R es la constante de los gases (0,082 litros × atm / [mol × °K]) y T es la temperatura a la que se midió el gas (en °K). Teniendo en cuenta que P es 1 Atmósfera y T es 312°K (39°C + 273), entonces un mol de cualquier gas (inclusive el CH₄) ocupa 22,415 litros. Luego se convierte el CH₄ en g (CH₄, 1 mol= 16 g), y se lo afecta por kg de MS incubada (CH₄-MSi), por kg de MS desaparecida (CH₄-MSD), por kg de MO desaparecida (CH₄-MOD). También

se analizó la PCH₄ de las botellas blanco para corregir el CH₄ no proveniente de la fermentación del sustrato analizado.

Pasadas las 24 h se interrumpió la fermentación con dos o tres gotas de timol saturado, se midió el pH (Hanna instruments HI 9025) y se tomaron alícuotas, preservadas con ácido ortofosfórico al 25% (i.e. relación ácido: muestra, 1: 5) para la determinación de AGV en un cromatógrafo Konik (modelo HRGC 5000b) equipado con un detector FID y una columna capilar Nukol (30 mt × 0,32 mm × 0,25 µm de espesor de capa, Perkin Elmer - Elite FFAP; Part. N°931-635-4). Se utilizó hidrógeno como gas carrier (2,4 ml H₂/min). Para la determinación de N-NH₃ se estabilizaron alícuotas de licor con ácido sulfúrico 0,02 N (i.e. relación ácido: muestra, 1: 1) y se utilizó un kit de uremia comercial (Wiener® lab).

Finalmente, el residuo de las botellas se filtró en vacío directamente dentro de bolsitas ANKOM® (ANKOM® Technology #F57 filter bags), para analizar ivDMS, ivDMO, DFDN e FDNd. El raigrás fue caracterizado por contenido de MS (105°C por 4 h) y MO (ignición a 600°C, AOAC, 1997). El contenido de proteína bruta (PB= N total × 6,25) fue determinado por Kjeldahl (AOAC, 1997); la fibra insoluble en detergente neutro con alfa-amilasa (aFDN_{MO}, Goering and Van Soest, 1970), fibra insoluble en detergente ácido (FDA_{MO}) y contenido de lignina (LDA_{MO}, Van Soest et al., 1991) fueron reportados libres de cenizas y determinados con equipo ANKOM®. El cociente entre el sustrato verdaderamente digerido *in vitro* (mg) y el volumen del gas producido *in vitro* (ml) fue expresado como el FP (que refleja la eficiencia de producción de proteína microbiana) y se estimó la BM según Blümmel et al. (1997a).

Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue en bloques completos aleatorizados (DBCA) con un arreglo factorial (i.e. 2 factores; Factor A= tratamientos; Ctrl, TC1, TC2 y TC3; Factor B= presencia y ausencia de PEG; P y N). Se llevaron a cabo 3 períodos (i.e. Período = Bloque), separados en el tiempo y utilizando licor ruminal de dos ovejas diferentes en cada período, con los cuales se obtuvieron 3 repeticiones para cada tratamiento. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha \times \gamma)_{ik} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde, Y_{ijkl}= variable en estudio; α_i= tratamientos, i.e. dosis de TC (i= 4); β_j= bloque (j= 3); γ_k= Ausencia o presencia de PEG (k= 2); (α × γ)_{ik}= interacción entre tratamientos y PEG; ε_{ijkl}= error experimental (l=3).

Las variables fueron analizadas usando el Proc GLM de SAS (2002). Se realizaron comparaciones múltiples usando el Test de Tukey (para la interacción tratamientos × PEG, y el efecto de la inclusión o no de PEG) o Dunnett (para los tratamientos, Ctrl vs TC1, TC2 y TC3) con un nivel de significancia p<0,05. Cuando la interacción no fue significativa se realizaron contrastes (i.e. Control vs Dosis; Dosis máxima vs Dosis mínima).

Resultados

Se encontró en las variables asociadas a la digestibilidad del raigrás en estudio (MS= 172 g/kg MH, MO= 819 g/kg MS, PB= 184 g/kg MS, aFDN_{MO}= 345 g/kg MS, FDA_{MO}= 164 g/kg MS, y LDA_{MO}= 14 g/kg MS) una interacción entre la adición de TC en el sustrato y el agregado o no de PEG, (p<0,05, Cuadro 1). Se observó un efecto inhibitorio del PEG en el accionar de los TC solo en la más elevada de las dosis estudiadas (TC3), ya que en las botellas con PEG las digestibilidades fueron mayores en comparación con aquellas botellas con igual dosis de TC pero sin PEG (Cuadro 1. TC3, N vs P, p<0,05). En las dosis menores de TC al igual que en el Ctrl, el PEG no tuvo efecto (p<0,05). Por otro lado, en ausencia de PEG, el TC2 y TC3 produjeron una disminución en la ivDMS, DFDN y FDNd al compararlo con el Ctrl (p<0,05).

La evaluación de la PGAN en los diferentes horarios analizados, no detectó diferencias entre el Ctrl y el agregado de TC (p>0,05, Figura 1), sin embargo al final de la fermentación (i.e. 24 h), el TC1 se comportó igual al Ctrl, y ambos produjeron menos gas que TC2 y TC3 (p<0,05).

Al analizar la cinética de producción de gas, solo al comienzo de la fermentación (T1), las dosis TC2 y TC3 presentaron

mayores tasas (p<0,05; Cuadro 2). En T20 el ANOVA detectó diferencias entre tratamientos, sin embargo, estas no fueron reflejadas por Dunnett. Para las tasas T3 y T6, el agregado de TC no produjo diferencias (p>0,05). En ninguna de las tasas la presencia de PEG generó diferencias (p>0,05).

No se encontraron diferencias significativas al evaluarse la producción de CH₄ afectado por MS incubada, desaparecida y MO desaparecida (media general; CH₄-MSi=8,8 g/kg MS incubada; EEM= 1,94; CH₄-MSD=10,3 g/kg MS desaparecida; EEM=2,26; CH₄-MOD= 9,9 g/kg MO desaparecida; EEM= 2,16; p>0,05; Figura 2). Tampoco el agregado el PEG tuvo incidencia en los datos observados (p>0,05).

En cuanto la caracterización del ambiente ruminal se obtuvieron diferentes respuestas en las variables analizadas. El pH no se vio afectado (media general= 7,15; p>0,05, Cuadro 3) por la utilización de diferentes dosis de TC. El agregado de TC3 aumentó la concentración de N-NH₃ (p<0,01), sin embargo dosis menores no produjeron cambios con respecto al Ctrl (p>0,05). Por otro lado, el agregado de TC no generó diferencias en la estimación de la producción o eficiencia de síntesis de proteína microbiana, observado en el FP y la BM (p>0,05). En ninguna de estas variables el agregado de PEG produjo diferencias (p>0,05).

Cuadro 1. Digestibilidad *in vitro* de raigrás, con el agregado de 0, 1,5, 3,0 y 4,5 mg de taninos condensados cada 100 mg de raigrás incubado (Ctrl, TC1, TC2 y TC3) con y sin agregado de polietilenglicol (P y N).

Table 1. *In vitro* digestibility of ryegrass, with the addition of 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mg of condensed tannins per 100 mg of incubated ryegrass (Ctrl, TC1, TC2 and TC3) with and without added polyethylene glycol (P and N).

Variables ¹	Ctrl		TC1		TC2		TC3		RCEE ²	Significancia ³		
	N n=3	P n=3	N n=3	P n=3	N n=3	P n=3	N n=3	P n=3		Trat	PEG	Int
ivDMS	870 _a	858 _{ab}	882 _a	886 _a	822 _b	849 _{ab}	826 _b	876 _a	13,2	***	**	**
ivDMO	901 _{ab}	900 _{ab}	927 _a	928 _a	863 _b	889 _{ab}	863 _b	916 _a	15,3	***	***	*
DFDN	704 _a	678 _{ab}	729 _a	739 _a	607 _b	656 _{ab}	603 _b	719 _a	28,1	***	*	**
FDNd	105 _a	101 _{ab}	108 _a	110 _a	90 _b	98 _{ab}	90 _b	107 _a	4,5	***	**	**

¹ ivDMS (Digestibilidad *in vitro* de materia seca, g/kg MS); ivDMO (Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, g/kg MO); DFDN (Digestibilidad *in vitro* de la FDN, g/kg FDN); FDNd (FDN digestible, g/kg MS). ²RCEE= Raíz cuadrada del error estándar de la media.

³Trat= tratamientos; PEG, Ausencia o presencia de polietilenglicol; Int= Interacción Trat × PEG. Comparaciones según Tukey. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05); *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

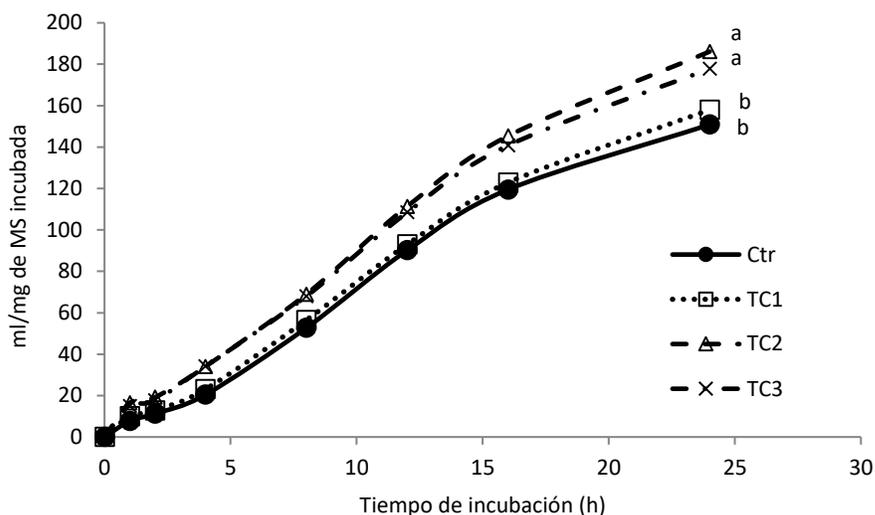


Figura 1. Producción de gas acumulada neta (ml/ g de MS incubada) con el agregado de 0, 1,5, 3,0 y 4,5 mg de taninos condensados cada 100 mg de raigrás incubado (Ctrl, TC1, TC2 y TC3). Letras diferentes en mismo horario indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para tratamientos. Comparaciones según Dunnett.

Figure 1. Net cumulative gas production (ml/ g DM incubated) with the addition of 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mg of condensed tannins per 100 mg of incubated ryegrass (Ctrl, TC1, TC2 and TC3). Different letters on the same hour indicate significant differences ($p < 0.05$) for treatments. Comparisons according to Dunnett.

Cuadro 2. Tasas horarias a la 1, 3, 6 y 20 h (T1, T3, T6 y T20 respectivamente, ml/h) de la fermentación *in vitro* de raigrás con el agregado de 0, 1,5, 3,0 y 4,5 mg de taninos condensados cada 100 mg de raigrás incubado (Ctrl, TC1, TC2 y TC3) con y sin agregado de Polietilenglicol (P y N).

Table 2. *In vitro* fermentation hourly rates of ryegrass at 1, 3, 6 and 20 h (T1, T3, T6 and T20 respectively), with the addition of 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mg of condensed tannins per 100 mg of incubated ryegrass (Ctrl, TC1, TC2 and TC3) with and without added polyethylene glycol (P and N).

Tasas (ml/h)	Tratamientos				RCEE ¹	Agregado de PEG		Significancia ²		
	Ctrl n=6	TC1 n=6	TC2 n=6	TC3 n=6		N n=12	P n=12	Trat	PEG	Int
T1	7,8 _b	10,0 _b	16,4 _a	14,9 _a	4,44	12,9	11,7	*	NS	NS
T3	4,6	5,2	7,4	8,2	2,51	6,4	6,3	NS [†]	NS	NS
T6	10,8	11,1	11,6	11,3	2,33	11	11,4	NS	NS	NS
T20	2,7	3,0	2,4	2,1	0,41	2,8	2,7	* ³	NS	NS

¹RCEE= Raíz cuadrada del error estándar de la media. ²Trat= tratamientos; PEG, Ausencia o presencia de polietilenglicol; Int= Interacción Trat × PEG. ³Las diferencias detectadas por ANOVA no fueron evidenciadas por el test de Dunnett. Letras diferentes en la misma fila para tratamientos, indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Comparaciones según Dunnett. NS= No significativo ($p > 0,05$); NS[†], $p < 0,10$; *, $p < 0,05$.

Evaluando el perfil de AGV, se observó que únicamente el ácido propiónico presentó diferencias con el agregado de TC. La concentración del mismo disminuyó un 29 % con el agregado de TC2 y TC3 con respecto al Ctrl ($p < 0,01$, Cuadro 3), mientras que TC1 fue igual al Ctrl. Además el agregado de PEG a las botellas determinó una disminución en la concentración de este AGV ($p < 0,05$). Analizando los contrastes, se observó una

diferencia generada por el agregado de TC y también entre dosis máxima y mínima (i.e. TC1 vs TC3, $p < 0,05$). En los demás AGV analizados (i.e. acético, butírico e iso-butírico) y en la concentración total de AGV, la adición de TC no provocó cambios en la producción ($p > 0,05$). Para iso-butírico si bien el ANOVA no detectó diferencias, en los contrastes se observó unas diferencias entre las dosis máxima y mínima ($p < 0,05$).

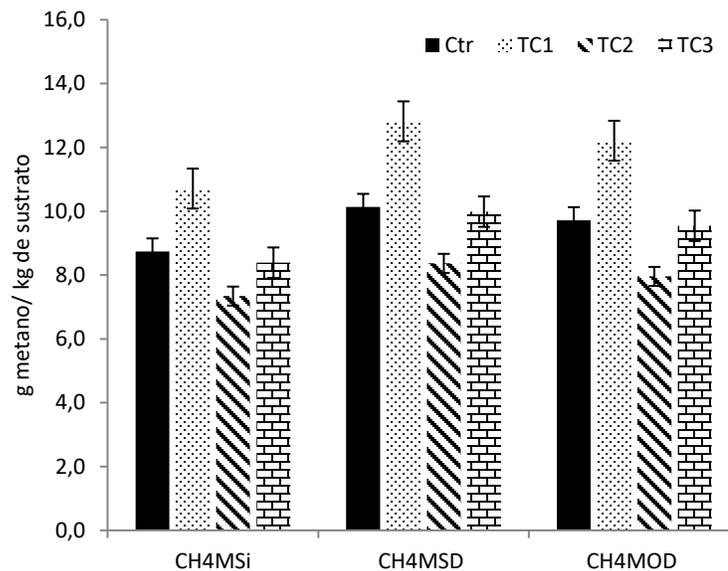


Figura 2. Producción de metano (g) afectado por kg de MS incubada (CH₄MSi), por kg de MS desaparecida (CH₄MSD) o por kg de MO desaparecida (CH₄MOD) de la fermentación *in vitro* del raigrás; con el agregado de 0, 1,5, 3,0 y 4,5 mg de taninos condensados cada 100 mg de raigrás incubado (Ctrl, TC1, TC2 y TC3). Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

Figure 2. Methane production (g) affected per kg of DM incubated (CH₄MSi), per kg of disappeared DM (CH₄MSD) or per kg of disappeared OM (CH₄MOD) of *in vitro* fermentation of ryegrass with the addition of 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mg of condensed tannins per 100 mg of incubated ryegrass (Ctrl, TC1, TC2 and TC3). Without differences ($p > 0.05$).

Discusión

Las dosis de TC que se evaluaron fueron elegidas teniendo en cuenta lo expuesto por Waghorn et al. (1997) quienes determinaron que dosis menores de 10 g de TC /100 g de MS en la dieta, el consumo de MS no se ve afectado y existen potenciales beneficios en el aprovechamiento y la distribución de energía. Por otro lado, dosis mayores a 2 mg de TC de

Quebracho/ 100 mg de sustrato podrían disminuir las emisiones de CH₄, aunque habría que tener en cuenta el potencial efecto negativo en el metabolismo proteico (Beauchemin et al., 2007).

Por estos motivos se propuso como dosis mínima 1,5 mg de TC/ 100 mg de sustrato y se duplicó esa concentración dos veces (3 y 4,5 mg de TC %) para observar el efecto del extracto sobre la digestibilidad *in vitro*, la PCH₄ y la distribución de la energía disponible del raigrás utilizado como sustrato.

Cuadro 3. Caracterización del ambiente ruminal de la fermentación *in vitro* de raigrás con el agregado de 0, 1,5, 3,0 y 4,5 mg de taninos condensados cada 100 mg de raigrás incubado (Ctrl, TC1, TC2 y TC3), con y sin agregado de Polietilenglicol (P y N).

Table 3. Characterization of the ruminal environment of the *in vitro* fermentation of ryegrass with the addition of 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mg of condensed tannins per 100 mg of incubated ryegrass (Ctrl, TC1, TC2 and TC3) with and without added polyethylene glycol (P and N).

Variables ¹	Tratamientos				RCEE ²	Agregado de PEG		Significancia ³			Contrastes ⁴	
	Ctrl n=6	TC1 n=6	TC2 n=6	TC3 n=6		N n=12	P n=12	Trat	PEG	Int	1	2
pH	7,2	7,1	7,2	7,2	0,04	7,1	7,1	NS	NS	NS	NS	NS
N-NH₃ (mg/lit)	8,4 _a	7,6 _a	10,4 _{ab}	11,8 _b	1,38	9,2	9,9	**	NS	NS	NS	*
FP	4,9	4,5	4,2	4,2	0,74	4,5	4,5	NS	NS	NS	NS	NS
BM	54,6	50,7	45,6	45,9	0,59	49,1	49,3	NS	NS	NS	NS	NS
Ácidos grasos volátiles (mMol/lit)												
C2	37,4	39,0	42,2	37,1	9,38	40,9	36,9	NS	NS	NS	NS	NS
C3	10,7 _a	9,9 _a	7,3 _b	7,1 _b	1,81	9,7	7,9	**	*	NS	*	**
C4-iso	0,98	0,90	0,42	0,52	0,435	0,85	0,56	NS	NS	NS	NS [†]	*
C4	4,9	3,4	5,0	3,4	1,41	4,6	3,8	NS	NS	NS	NS	NS
C2:C3	3,5 _b	4,3 _b	5,8 _a	5,7 _a	0,82	4,4	5,1	**	*	**	***	*
AGV Total	54,0	57,6	50,5	48,2	8,52	52,3	49,1	NS	NS	NS	NS	NS

¹N-NH₃, Nitrógeno proveniente del amoníaco; FP, Factor de Partición (mg de MO degradada real/ ml PGAN); BM, Biomasa microbiana (mg/100 mg MO degradada real); C2, Ac. acético; C3, Ac. propiónico; C4-iso, Ac. iso-butírico; C4, Ac. butírico; C2:C3, Relación entre ac. acético y ac. propiónico; AGV Total, sumatoria de C2,C3, C4-iso y C4, ²RCEE= Raíz cuadrada del error estándar de la media. ³Trat= Tratamientos; PEG, Ausencia o presencia de polietilenglicol; Int= Interacción Trat × PEG.; ⁴Contrastes N°1= Control vs TC; N° 2= Dosis máxima vs Dosis mínima (TC1 vs TC3). Comparaciones según Dunnett. Letras diferentes en la misma fila para tratamientos, indican diferencias significativas (p<0,05). NS = No significativo (p>0,05); NS[†], p<0,1; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

Efecto de los TC sobre la digestibilidad del raigrás

El raigrás (*Lolium perenne*) utilizado como sustrato en este ensayo es una de las gramíneas forrajeras más difundidas y utilizadas como alimento de rumiantes, en regiones de climas templado-húmedos y suelos ricos. Principal forraje para pastoreo y heno en Europa occidental y muy difundido en Australia y Nueva Zelanda, y por supuesto, en Argentina. Su principal área de cultivo en Argentina es el Centro y Sudeste de la Provincia de Buenos Aires, pero también puede verse formando parte de valles y mallines de la Patagonia. Los resultados muestran que las distintas dosis de TC afectaron diferencialmente la ivDMS, ivDMO, DFDN y la FDNd del raigrás en estudio (cuadro 1). Solo con la aplicación de la dosis más alta de TC (4,5 mg TC/ 100 mg MS) la disminución en la digestibilidad ($p < 0,01$) se debió a un efecto específico de los TC, observado por la diferencia entre P y N.

Esta respuesta coincide con otros estudios que analizaron el comportamiento de TC de Quebracho, en sustratos como heno de alfalfa (Al-Dobaib, 2009) o silaje de cebada (Beauchemin et al., 2007), donde no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en la digestibilidad agregando hasta 1,5 o 2 mg TC/ 100 mg de sustrato, lo cual se correspondería con los valores hallados en el presente trabajo para el tratamiento TC1 (1,5mg TC/ 100mg sustrato). Sin embargo Al-Dobaib (2009) si observó una reducción con valores de 2,25 mg/ 100 mg de sustrato, coincidiendo con Carulla et al., (2005), quienes encontraron reducciones en las digestibilidades *in vivo* de FDN y FDA con 4,1 mg TC/ 100 mg MS de la dieta, aunque utilizando un extracto de *Acacia mearnsii*. Sin embargo existe evidencia que los efectos sobre digestibilidad, así como los efectos en protección de la proteína dietaria o el rol mitigador de metano y otros GEIs de los TC, no sólo dependen de la dosis y los sustratos sobre los cuales son utilizados como aditivos. Los comportamientos disímiles observados con la adición de TC en fermentaciones de forrajes depende en mayor medida de la fuente donde fue obtenido el TC (Carreño et al. 2015, Huang et al., 2010), el procedimiento de extracción y purificación (Barahona Rosales, 1999,) así como también en las diferencias en el peso molecular o la composición monomérica de los TC (Barahona, 1999; Barahona et al., 2006).

Esta menor degradación de la celulosa debido al efecto de los TC, podría deberse a una inhibición de la acción específica de enzimas celulolíticas, implicadas en la degradación de la fibra (McSweeney et al., 2001) o también por un efecto indirecto donde los taninos que forman un complejo ligno-celulósico evitando, de esta forma, el ataque enzimático (Patra and Saxena, 2011), demostrado por las reducciones en el aprovechamiento de estos forrajes al agregar dosis altas de TC.

Gases de fermentación afectados por la presencia de TC

Existen varios trabajos realizados los últimos años, tanto *in vivo* (Carulla et al., 2005; Pathak et al., 2017; Piñeiro-Vázquez et al., 2018) como *in vitro* (Min et al., 2005; Supamong et al., 2017) en el cual el uso de los TC como mitigador del CH₄ fue probado. Estos efectos en la disminución de la PCH₄ pueden estar relacionados directamente con una disminución en la degradabilidad de la fibra (Tavendale et al., 2005). Sin embargo, en este trabajo no hubo diferencias en la PCH₄, aun afectando dicha producción por la DFDN (Figura 2), por lo cual, la falta de efecto pudo ser consecuencia de una falla en la supresión de microorganismos metanógenicos (Bueno et al., 2015) o de una menor efectividad de los TC a formar complejos con los carbohidratos debido a la especificidad por peso molecular, que poseen los TC para formar la unión (Bodas et al., 2012; Patra and Saxena, 2011). Sin embargo, este último factor sería descartado ya que al aumentar la concentración de TC en las botellas, disminuyó la digestibilidad *in vitro*.

El accionar de los TC depende de la concentración (Patra and Saxena, 2011) y de sus características químicas (concentración de ácidos fenólicos y grupo hidroxilos, Goel and Makkar, 2012). Teniendo en cuenta esta premisa, es probable que el extracto comercial utilizado no fuese efectivo a las dosis estudiadas, coincidiendo con Goel y Makkar (2012), quienes, con dosis similares a las del presente experimento, utilizando extractos de Quebracho (*Schinopsis* sp.) o mimosa (*Mimosa caesalpineaeifolia*) no encontraron evidencias de un efecto mitigador. Sin embargo, otras fuentes de TC, tal como *Acacia mearnsii* o sulla (*Hedysarum coronarium*) (Grainger et al., 2009; Woodward et al., 2002) o madera de castaño (*Castanea sativa*, Moscoso M. et al., 2017) produjeron resultados satisfactorios en estudios *in vivo*.

Por otro lado, la PGAN a las 24 h aumentó al incluir las dosis más altas de TC (3,0 y 4,5 mg/100 mg MS) lo que podría indicar efectos de los TC en el perfil gaseoso; en consonancia con Medjekal et al. (2017) que encontraron aumentos en la PG *in vitro* a las 24 h con la adición de raíces de *Zingiber officinale* como fuente de TC. Si bien el test de Dunnett no pudo encontrar diferencias entre los tratamientos en las primeras horas de fermentación, la PGAN tiende a aumentar con la presencia de TC (Figura 5). Estos resultados se contraponen a lo reportado por Jayanegara et al., (2015), quienes encontraron que distintas fuentes de TC (incluyendo Quebracho) generaban una disminución en la PGAN.

De todas formas, los cambios encontrados en la digestibilidad solo se atribuyeron a las dosis más elevadas (efecto específico de los TC en TC3), que relacionado con una mayor PGAN, nos refleja una ineficiente distribución de la

energía (Blümmel et al., 1997b) no sólo teniendo en cuenta el aprovechamiento de la MS, sino también al evaluar los patrones de fermentación, aunque esto no se vea reflejado estadísticamente en el FP o la BM. Estos patrones ineficientes de TC3 están originados fundamentalmente durante las primeras horas de fermentación.

Ambiente ruminal y productos de fermentación

El pH no varió significativamente manteniéndose en un promedio de 7,2 (Cuadro 3). Teniendo en cuenta que la tasa de PCH₄ se vería afectada por el pH obteniéndose los máximos valores a pH altos (≥ 7 , Van Kessel and Russell, 1996), al no existir diferencias en la PCH₄ entre los tratamientos, es coincidente con el mantenimiento del pH en el medio de incubación.

Por otro lado, se especulaba que la protección de las proteínas a la degradación ruminal producto de la formación de complejos tanino-proteína, genere una disminución en los valores de N-NH₃, el cual refleja el N subutilizado por la población bacteriana ruminal, en los tratamientos con TC (Goel and Makkar, 2012). Sin embargo, si bien no hubo diferencias con las dosis menores, el aumento de N-NH₃ en TC3, refleja una degradación proteica sustancial, que podría deberse a la pobre formación de los complejos antes mencionados (Beauchemin et al., 2007) o a una reducción de los efectos inhibitorios sobre la actividad proteolítica en algunas bacterias, los cuales pueden ser producidos por interacciones de los TC con enzimas extracelulares bacterianas, acción directa sobre la morfología celular o indirecta, al dificultar la captación de nutrientes por parte de estos microorganismos (Patra and Saxena, 2011).

En cuanto al perfil de AGV, se especulaba que, relacionado con el efecto mitigador de CH₄ de los TC, la relación acético: propiónico debería ser menor en los tratamientos con agregado de estos compuestos (Medjekal et al., 2017), ya que el acetato y el butirato promueven la PCH₄, mientras que la formación de propionato puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H⁺ en el rumen (Moss et al., 2000). En adición, Supamong et al. (2017) encontraron un descenso en la PCH₄ asociado a un aumento en la producción de ácido propiónico en dietas mixtas (relación forraje: concentrado, 70:30), con el agregado de 11,7 mg MS de harina de semillas de *Delonix regia*, que contienen taninos, comparando la misma dieta sin semillas.

Sin embargo, en el presente trabajo, la relación acético: propiónico aumentó con las dosis más alta de TC. Este efecto de TC2 y TC3 es consecuencia de la menor producción de propiónico, ya que el acético se mantuvo constante entre tratamientos, sin diferencias entre Ctrl y TC. Si asociamos este perfil fermentativo a falta de diferencia de las PCH₄ reportadas, podemos observar una relación directa con las producciones de acético similares para los cuatro tratamientos, que liberarían equivalentes cantidades de H⁺ al medio (Moss et al., 2000).

En contraposición, Beauchemin et al. (2007), observaron que las concentraciones de acético disminuían linealmente con el aumento de TC, mientras que el propiónico se mantenía constante, generando así una disminución lineal en la relación acético: propiónico. Sin embargo, al evaluar en este trabajo la proporción relativa del acético en la concentración de AGV total, se encontró una diferencia de ocho puntos porcentuales entre Ctrl y TC2 y TC3 (i.e.; Ctrl= 69,2%, TC1= 77,2%, TC3= 76,8%). Esta diferencia en la importancia relativa podría explicar estequiometricamente la mayor PG (Wolin, 1960), generada por TC2 y TC3. Esta mayor producción relativa de acético estaría relacionada, además, con una menor producción de BM, ya que la eficiencia de proteína microbiana esta inversamente relacionada con la PG (Blümmel et al., 1997a). Aunque no se encontraron diferencias entre la producción de BM entre los tratamientos, TC2 y TC3 produjeron un 16 % menos comparados con el Ctrl, que no fue detectado por el ANOVA, presuntamente por la variabilidad de los datos analizados. Esta misma respuesta se ve reflejada en la similitud encontrada en los FP de los tratamientos evaluados.

Conclusiones

Los patrones de fermentación del raigrás evaluados en el sistema *in vitro* se vieron afectados por la inclusión de TC, fundamentalmente en las dosis más elevadas. La dosis de 4,5 mg de TC/100 g MS (TC3) produjo una disminución de la digestibilidad del alimento por acción específica de los TC, afectando además la eficiencia de utilización del alimento, sin embargo, la PCH₄ *in vitro* no se vio afectada por la inclusión de TC. Por otro lado, la relación acético: propiónico aumentó en TC2 y TC3, debido a una disminución del propiónico y aunque el aumento relativo de acético en términos porcentuales explica la disminución de CH₄, estas dosis presentaron las mayores PGAN. Se concluye que a las dosis estudiadas, la fuente de TC generó patrones fermentativos diferenciados pero no fue efectiva para disminuir el potencial metanogénico del raigrás.

Bibliografía

- AL-DOBAIB, S.N. 2009. Effect of different levels of Quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. *Anim. Sci. J.* 80: 532–541.
- AOAC, 1997. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. Arlington, VA, USA.
- BARAHONA ROSALES, R. 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. PhD Thesis. The University of Reading, U.K. 400 p.

- BARAHONA, R., SÁNCHEZ, S., LASCANO, C.E., OWEN, E., MORRIS, P. and THEODOROU, M.K. 2006. Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enz. Microb. Technol.* 39(2): 281-288.
- BEAUCHEMIN, K.A., KREUZER, M., O' MARA, F. and MCALLISTER, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement : a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 21–27.
- BEAUCHEMIN, K.A., MCGINN, S.M., MARTINEZ, T.F. and MCALLISTER, T.A. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 1990–1996.
- BLÜMMEL, M., MAKKAR, H.P.S. and BECKER, K. 1997a. In vitro gas production: a technique revisited. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 77: 24–34.
- BLÜMMEL, M., STEINGASS, H. and BECKER, K. 1997b. The relationship between *in vitro* gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77: 911–921.
- BLÜMMEL, M. and LEBZIEN, P. 2001. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by *in vitro* techniques. *Livest. Prod. Sci.* 68: 107–117.
- BODAS, R., PRIETO, N., GARCÍA-GONZÁLEZ, R., ANDRÉS, S., GIRÁLDEZ, F.J. and LÓPEZ, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176: 78–93.
- BUENO, I.C.S., BRANDI, R.A., FRANZOLIN, R., BENETEL, G., FAGUNDES, G.M., ABDALLA, A.L., LOUVANDINI, H. and MUIR, J.P. 2015. *In vitro* methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205: 1–9.
- CARREÑO, D., HERVÁS, G., TORAL, P.G., BELENGUER, A. and FRUTOS, P. 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate *in vitro* ruminal biohydrogenation in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 202: 42–51.
- CARULLA, J.E., KREUZER, M., MACHMÜLLER, A. and HESS, H.D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 961–970.
- FAOSTAT. 2014. Livestock poultry production. Food Agric. Organ. United Nations. URL <http://faostat.fao.org/>
- GOEL, G. and MAKKAR, H.P.S. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44: 729–39.
- GOERING, H.K. and VAN SOEST, P.J. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). *Agric. Handb.* 379.
- GRAINGER, C., CLARKE, T., AULDIST, M.J., BEAUCHEMIN, K.A., MCGINN, S.M., WAGHORN, G.C. and ECKARD, R.J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89: 241–251.
- HUANG, X.D., LIANG, J.B., TAN, H.Y., YAHYA, R., KHAMSEKHIEW, B. and HO, Y.W. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of Leucaena condensed tannins and their effects on *in vitro* fermentation parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159(3-4): 81-87.
- JAYANEGARA, A., MAKKAR, H.P.S. and BECKER, K. 2015. Addition of Purified Tannin Sources and Polyethylene Glycol Treatment on Methane Emission and Rumen Fermentation *in vitro*. *Media Peternak.* 38: 57–63.
- KNAPP, J.R., LAUR, G.L., VADAS, P.A., WEISS, W.P. and TRICARICO, J.M. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97: 3231–3261.
- LASA, J., MANTECÓN, C. y GÓMEZ, M.Á. 2010. Utilización de taninos en la dieta de rumiantes. *PV Albéitar*, pp 1-52.
- LOPEZ, S. and NEWBOLD, C.J. 2007. Analysis of methane. In Makkar, H.P.S., Vercoe, P.E. ed. *Measuring Methane Production from Ruminants*. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp. 1–14.
- MAKKAR, H.P.S. 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. A laboratory manual, 1st ed. Vienna, Austria. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.
- MAKKAR, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49: 241–256.
- MARTIN, C., MORGAVI, D.P. and DOREAU, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351–365.
- MCDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREENHALGH, J.F.D., MORGAN, C.A., SINCLAIR, L.A. and WILKINSON, R.G. 2010. *Animal nutrition*. 7th ed. London, Pearson, 665 p.
- MCSWEENEY, C.S., PALMER, B., MCNEILL, D.M. and KRAUSE, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 83–93.
- MEDJEKAL, S., BODAS, R., BOUSSEBOUA, H. and LÓPEZ, S. 2017. Evaluation of three medicinal plants for methane production potential, fiber digestion and rumen fermentation *in vitro*. *Energy Proc.* 119: 632–641.
- MIN, B.R., PINCHAK, W.E., FULFORD, J.D. and PUCHALA, R. 2005. Wheat pasture bloat dynamics, *in vitro* ruminal gas production, and potential bloat mitigation with condensed tannins. *J. Anim. Sci.* 83: 1322–1331.

- MOSCOSO, M.J.E., FRANCO, F.F., SAN MARTÍN, H.F., OLAZÁBAL, L.J., CHINO, V.L.B. y PINARES-PATÍÑO, C.S. 2017. Producción de Metano en Vacunos al Pastoreo Suplementados con Ensilado, Concentrado y Taninos en el Altiplano Peruano en Época Seca. *Rev. Investig. Vet. del Perú*. 28: 822-827.
- MOSS, A.R., JOUANY, J.P. and NEWBOLD, J. 2000. Review article Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231–253.
- ORTIZ, D.M., POSADA, S.L. y NOGUERA, R.R. 2014. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livest. Res. Rural Dev.* 26: 1-8.
- PATHAK, A.K., DUTTA, N., PATTANAIK, A.K., CHATURVEDI, V.B. and SHARMA, K. 2017. Effect of condensed tannins from *Ficus infectoria* and *Psidium guajava* leaf meal mixture on nutrient metabolism, methane emission and performance of lambs. *Asian Austral J. Anim.* 30: 1702–1710.
- PATRA, A.K. and SAXENA, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 91: 24–37.
- PIÑEIRO-VÁZQUEZ, A.T., JIMÉNEZ-FERRER, G., ALAYON-GAMBOA, J.A., CHAY-CANUL, A.J., AYALA-BURGOS, A.J., AGUILAR-PÉREZ, C.F. and KU-VERA, J.C. 2018. Effects of quebracho tannin extract on intake, digestibility, rumen fermentation, and methane production in crossbred heifers fed low-quality tropical grass. *Trop. Anim. Health Prod.* 50: 29–36.
- SAS, 2002. User's Guide: Statistics Ver 9.0.
- SUPAPONG, C., CHERDTHONG, A., SEANKAMSORN, A., KHONKHAENG, B., WANAPAT, M., URIYAPONGSON, S., GUNUN, N., GUNUN, P., CHANJULA, P. and POLYORACH, S. 2017. *In vitro* fermentation, digestibility and methane production as influenced by Delonix regia seed meal containing tannins and saponins. *J. Anim. Feed Sci.* 26: 123–130
- TAVENDALE, M.H., MEAGHER, L.P., PACHECO, D., WALKER, N., ATTWOOD, G.T. and SIVAKUMARAN, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124: 403–419.
- THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S., MCALLAN, A.B. and FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185–197.
- VAN KESSEL, J. and RUSSELL, J.B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 205–210.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B. and LEWIS, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583–3597.
- WAGHORN, G.C., REED, J.D. and NDLOVU, L.R. 1997. Condensed Tannins and Herbivore Nutrition. In *International Grassland Congress ed. Proceedings XVIII IGC*. Winnipeg, Manitoba. pp. 153-166.
- WOLIN, M. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sc.* 43: 1452-1459.
- WOODWARD, S.L., WAGHORN, G.C., LASSEY, K.R. and LABOYRIE, P.G. 2002. Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 62: 227–230.