

## Efectos del contenido de taninos condensados de algunas especies de leguminosas en la emisión de gas metano

Y. Gurbuz

University of Bingol, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Bingol-Turkey  
Correo electrónico: yavuzselim-06@hotmail.com

Se estudiaron los efectos de taninos condensados en la formación de metano, gas total, y ácidos grasos volátiles en algunas especies de leguminosas forrajeras. Hubo diferencias significativas entre las especies de leguminosas en cuanto a los taninos condensados ( $P < 0.01$ ). Los contenidos de taninos condensados de *Coronilla orientalis* (CO), *Coronilla parviflora* (CPW), *Dorycnium pentaphyllum* (DP), *Arygrolobium* (A), *Lotus corniculatus* Trabzon (LCT), *Lotus langustissimus* (LA) y *Lotus corniculatus vartenofolius* (LCV) fueron de 3.78, 103.78, 18.41, 0.75, 22.19, 55.58, y 8.97 mg/kg materia seca, respectivamente. De la misma forma, el metano acumulado, el dióxido de carbono, y el volumen total de gas (mL/1.0 g materia seca) a las 144 h fueron mayores para *Lotus corniculatus vartenofolius* (27.98 mL, 210.94 mL, 270.00 mL). El metano, el dióxido de carbono, y el volumen total de gas (mL/1.0 g materia seca) a las 144 h fueron menores ( $P < 0.05$ ) para *Dorycnium pentaphyllum* (15.07 mL, 132.00 mL, 190.50 mL, respectivamente). El contenido de taninos condensados en la leguminosas disminuyó la producción de gas total, de metano, y de dióxido de carbono en todas las especies de leguminosas forrajeras. No hubo diferencias en la producción total de ácidos grasos volátiles, ácido acético, y ácido propiónico, y el pH para el fluido ruminal fermentado en todas las especies de leguminosas forrajeras en el período experimental (144 h). Sin embargo, hubo diferencias en la concentración de amoníaco, i-Butírico (i-B) n-Butírico (n-B), n-Valérico (n-V), i-Valérico (i-V), en el fluido fermentado, y la proporción acetato-propionato se vio afectada en todas las leguminosas forrajeras ( $P < 0.01$ ). La proteína bruta osciló, como promedio, desde 13.2 hasta 19.3 % de la materia seca. Los contenidos de fibra neutro detergente y lignina ácido detergente oscilaron entre 33.17 y 46.64 % de materia seca y entre 29.51 y 43.16 % de materia seca, respectivamente. Los valores más bajos correspondieron a *Lotus corniculatus*, y los más altos a *Dorycnium pentaphyllum*, cosechados en la etapa de floración. Los resultados indican que el contenido de taninos condensados en la producción de metano puede decrecer por efectos indirectos mediante la vía de la producción reducida de hidrógeno (y presumiblemente la digestibilidad de forraje reducida) y mediante la vía directa de efectos inhibidores en la metanogénesis.

Palabras clave: emisión de metano, dióxido de carbono, taninos condensados, leguminosas forrajeras, producción de gas in vitro.

Las investigaciones acerca de la nutrición de rumiantes se han centrado en el hallazgo de métodos para reducir las emisiones de metano debido al papel del metano en el calentamiento global. El metano producido durante la fermentación anaeróbica en el rumen representa de 2 a 12 % de la pérdida de energía neta en el animal hospedero y contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero al medio (Moss 1993, Hegarty 1999 y Clark 2002). Muchas reseñas han destacado las estrategias de mitigación para reducir las emisiones de metano entérico ( $\text{CH}_4$ ) de los rumiantes (Johnson y Johnson 1995, Mathison *et al.* 1998 y Beauchemin *et al.* 2008).

No obstante, una debilidad de la mayoría de las estrategias es que requieren regímenes de alimentación en los que la dieta del rumiante pueda controlarse fácilmente y donde se pueda ofrecer alimentación suplementaria para facilitar la introducción de aditivos dietéticos. Hay informes recientes de menores emisiones de metano por rumiantes que consumen forrajes de niveles de taninos condensados (TC) de bajos a moderados vs descartables, determinados *in vitro* e *in vivo* en ganado vacuno (Roth *et al.* 2002 y Woodward *et al.* 2001 y 2002). Los taninos condensados se encuentran en muchas plantas alrededor del mundo. Por lo tanto, si se establece que los TC pueden consistentemente y, a largo plazo, reducir la producción de metano de los rumiantes, hay potencial para su amplio uso y efecto marcado. Los efectos de los TC en los rumiantes varían con el tipo de tanino o fuente vegetal.

Similar a la variación entre las plantas y los TC, las diferentes especies de rumiantes varían en respuestas a los TC.

Sin embargo, las leguminosas como fuentes de alimentación animal tienen, en general, altas concentraciones de nitrógeno (N), nutriente crítico en la estación seca. Una limitación principal es la presencia de compuestos vegetales secundarios tales como los taninos hidrolizables y condensados, que pueden disminuir el consumo alimentario y la utilización por los animales (Dube 1993 y Norton 1994). Numerosas especies de leguminosas forrajeras contienen taninos condensados (TC) en su follaje (Douglas *et al.* 1999), por ejemplo el cuernecillo (*Lotus corniculatus*) y loto (*Lotus pedunculatus*) que tienen significativo potencial agronómico en la agricultura. No obstante, hay algunas indicaciones que los taninos en la dieta pudieran ayudar a reducir la producción ruminal de metano cuando se encuentran en cantidades significativas en las leguminosas forrajeras (Waghorn *et al.* 2002). Se cree que los efectos de la producción de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  observados en la evaluación *in vitro* de los contenidos de taninos condensados (TC) de siete leguminosas forrajeras se deban en parte al contenido de TC de la leguminosa. Además, estas mediciones sugieren menor producción de  $\text{CH}_4$  de los forrajes que contenían TC que los que no los contenían, pero los efectos del contenido de taninos condensados en las leguminosas en la producción de  $\text{CH}_4$  se evaluaron debido a los efectos de los TC en  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Además, el objetivo de este estudio

fue evaluar los efectos de los taninos en algunas especies de leguminosas en la producción de gas *in vitro* del rumen y su cinética. La producción de metano, de gas total, ácidos grasos volátiles (AGF), y la formación de amoníaco se determinaron en el tampón del fluido ruminal.

### Materiales y Métodos

En los análisis *in vitro*, las mediciones de la emisión de metano y los análisis químicos se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencias Biológicas, Medioambientales y Rurales (IBERS), en el Reino Unido. Los experimentos *in vitro* y análisis químicos se realizaron por separado para cada muestra usando diseño completamente aleatorizado. Las muestras se evaluaron por triplicado. El forraje se obtuvo de siete especies de leguminosas: *Coronilla orientalis* (CO), *Coronilla parviflora* (wild) (CPW), *Dorycnium pentaphyllum* (DP), *Arygrobium* (A), *Lotus corniculatus* (LCT) (Trabzon), *Lotus corniculatus vartenofolius* (LCV) y *Lotus langustissimus* (LA). Las muestras de forraje se recolectaron de diferentes zonas de Turquía: *Coronilla orientalis* (CO) de Adéyaman-Gölba<sup>o</sup>; *Coronilla parviflora* (CP) de Kahramanmaraş-Zeytin; *Dorycnium pentaphyllum* (DP) de Kahramanmaraş-Menzelet; *Arygrobium crotarioides* de Gaziantep-Nizip; *Lotus corniculatus* var. *Corniculatus* de Trabzon-Uzungöl; *Lotus corniculatus* var. *tenuifolius* (LCV) de Adéyaman-Gölba<sup>o</sup> y *Lotus langustissimus* (LA) de Hatay- Kérá Khan. Las áreas están localizadas a N 36°: 30' - N 41°: 00', W 36°: 21' - W 39° - 43' de altitud-longitud. Estas áreas estaban a 900, 580, 580, 510, 1800, 900 y 190 m sobre el nivel del mar, y la temperatura era de 14.45, 17.05, 17.05, 18.20, 14.45, y 19.25 °C, respectivamente. La precipitación anual promedio de estas áreas era de 692, 727, 727, 380, 831, 692, y 562 mm, respectivamente. Las leguminosas se cosecharon manualmente en el período de floración, al menos, cada especie fue seleccionada al azar en cuatro locaciones en el período de floración a fructificación. Las muestras cosechadas se agruparon para cada especie individual de leguminosa y, después, se sequearon a temperatura ambiente en una habitación oscura durante 5 días hasta peso constante para el análisis de los compuestos fenólicos y la producción de gas *in vitro*, las muestras se molieron y pasaron a través de un tamiz de 1 mm. Las muestras fueron después submuestreadas para obtener tres muestras para cada una de las tres especies y se usaron para el análisis de laboratorio.

*Experimento de producción de gas in vitro.* En el experimento, se estudiaron las plantas *Coronilla orientalis* (CO), *Coronilla parviflora* (silvestre) (CPW), *Dorycnium pentaphyllum* (DP), *Arygrobium* (A), *Lotus corniculatus* (LCT) (Trabzon), *Lotus corniculatus vartenofolius* (LCV) y *Lotus langustissimus* (LA). Los forrajes se estudiaron para determinar las características de su

fermentación ruminal *in vitro* mediante la técnica de transductor de presión de gas según Theodorou *et al.* (1994). Un gramo de materia seca de forraje se pesó en los frascos de suero con 150 mL de capacidad. Los frascos se llenaron de 85 mL de una mezcla de solución mineral y buffer y 4 mL de agente reductor (Menke y Steingass 1988). Después de agregar 10 mL de fluido ruminal, se incubaron tres réplicas de cada tratamiento en baño de agua pre-calentado a 39 °C. Adicionalmente, se incubaron seis blancos sin material vegetal, pero con solución buferante, agente reductor y fluido ruminal en cada experimento. El fluido ruminal mezclado se recolectó de dos ovinos canulados en el rumen que pastaban en pasto dominado por gramíneas (calidad media de alimento). Los frascos de suero se sellaron mediante tapas de goma y la presión de gas se ajustó a cero mediante un transductor y voltímetro de lectura digital LED. La presión y el volumen de gas se anotaron a las 3, 6, 10, 16, 24, 30, 37, 47, 60, 72, 96 y 144 h después de la inoculación. La producción acumulada de metano y dióxido de carbono se extrapolaron por análisis de regresión no-lineal como:  $y = a + b(1 - e^{-ct})$ ; donde y (mL) = gas producido a tiempo t (min), a = primera producción de gas, b = segunda producción de gas y c = tasa fraccional de la producción de gas (Ørskov y McDonald 1979). Todos los análisis químicos se llevaron a cabo por triplicado. Después de la última medición, los frascos se almacenaron a 4 °C hasta su posterior procesamiento. Una cantidad de 30 mL del fluido fermentado se centrifugó en hielo durante 15 min a 30 000 x g. Las sub-muestras del sobrenadante se recolectaron para la subsecuente determinación del pH, el potencial redox y la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV). Para la determinación de los AGV, 1.6 mL de fluido fermentado se desproteinizó con 0.4 mL de ácido metafosfórico (250 g/L). Después, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

*Análisis químicos.* Los forrajes individuales se sometieron a análisis. Las muestras se almacenaron a -20 °C antes de su posterior análisis. El contenido de materia seca de las muestras se determinó por liofilizado para el análisis químico. Las cenizas se incineraron por muestras al calor en una mufla a 550 °C durante 6 h. El análisis de materia seca (MS), proteína bruta (PB), y cenizas se realizaron según AOAC (1995). Las concentraciones de nitrógeno total (NT) se determinaron mediante el analizador de nitrógeno Leco FP 428 y se expresaron como PB (nitrógeno total x 6.25) (AOAC 1995). Las concentraciones de CSA (carbohidratos solubles en agua) se determinaron mediante espectrofotometría usando antrona en ácido sulfúrico en autoanalizador (Thomas 1977). Los ácidos grasos volátiles (AGV) se analizaron mediante cromatografía gaseosa según Zhu *et al.* (1996). El N amoniacal se analizó según el método de Bremner y Keeney (1965). Las determinaciones de las concentraciones de FND y

FAD se realizaron según el método de Van Soest *et al.* (1991). Los contenidos de los TC extraíbles y enlazados en los forrajes individuales se determinaron según las sugerencias de Terrill *et al.* (1992) y Makkar *et al.* (1995). Los taninos purificados, extraídos de cada material mediante el procedimiento de Hagerman y Butler (1980), se usaron como estándares. Los análisis de pH se realizaron en pH-metro, modelo 8102 ross, Orion Research Inc, Beverly, MA, Estados Unidos.

**Emisión de metano y taninos condensados.** Se determinaron los taninos condensados totales como la suma de las fracciones extraíbles (soluble en acetona) y enlazadas, alrededor de 200 mg de muestras de hojas y tallos liofilizados usando una modificación del método de butanol ± HCl de Terrill *et al.* (1992) y Carter *et al.* (1997). La producción de gas metano y dióxido de carbono de cada fermentación se midieron continuamente mediante analizadores infrarrojos de gas (Takasugi Seisakusho Co Ltd. Tokio, Japón) y los datos se agruparon a una interface de computación (Pen 2007).

**Análisis estadísticos.** La composición química (MS, PB, FAD, FND, CSA y las cenizas), la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV), los AGV totales, el amoníaco ruminal (NH<sub>3</sub>-N), y la producción total de gas, gas metano, gas dióxido de carbono, pH, ácido acético/ácido propiónico, contenido de taninos condensados de las siete especies de leguminosas. Se analizaron mediante diseño completamente aleatorizado mediante procedimientos GLM de SAS (1999) (versión 8e, SAS Inst., Inc., Cary NC), con el modelo que consistía en el tratamiento. Las diferencias entre las medias se determinaron según Duncan (1955).

**Resultados y Discusión**

La composición química y los taninos condensados de las leguminosas *Coronilla orientalis* (CO), *Coronilla parviflora* (silvestre) (CPW), *Dorycnium pentaphyllum* (DP), *Arygrobium* (A), *Lotus corniculatus* (LCT) (Trabzon), *Lotus corniculatus vartenofolius* (LCV), *Lotus langustissimus* (LA)) se muestran en la tabla 1. Los contenidos de cenizas, PB, FND, FAD, y CSA fueron altamente variables, con diferencias significativas (P < 0.01) entre las diversas especies.

La tabla 1 muestra que la menor PB fue para A, mientras la mayor tasa de PB fue para CPW. DP tuvo los mayores contenidos de FND y FAD, mientras LTC tuvo los menores. CO presentó el mayor valor de CSA, mientras el menor fue para DP. Las composiciones químicas de los forrajes estuvieron en el rango informado en la literatura para forrajes de ramoneo de Kenya (Osuga *et al.* 2005 y Abdulrazak *et al.* 2000). Las variaciones en la composición química entre las diferentes especies de leguminosas y sus follajes se pueden deber, en parte a factores genotípicos que controlan la acumulación de nutrientes de los forrajes. La acumulación de nutrientes en las plantas es una propiedad de las especies (Minson 1990) y varía entre especies. Las diferencias en PB, FND, FAD, CSA, TC y cenizas podría de igual forma deberse a diferencias en las especies en los factores genotípicos. El contenido de PB difirió entre las especies de plantas, así como el contenido de cenizas, FND y FAD (Haddi *et al.* 2003). El contenido de cenizas, que es característico de las leguminosas forrajeras tales como las herbáceas y las especies de Lotus oscila entre 6.25 y 13.04 % MS. El contenido en las leguminosas estudiadas en esta investigación estuvo en concordancia con estos resultados.

Los forrajes de leguminosas tuvieron contenido de fibra de bajo a moderado. Esto es un atributo positivo de los forrajes de ramoneo puesto que la digestibilidad de la MS depende de los constituyentes de la pared celular (fibra), especialmente FND y lignina (Bakshi y Wadhwa 2004). Además, la fibra de las especies de leguminosas forrajeras se ha demostrado que es más digerible (Hassan *et al.* 2000) que el de las gramíneas y los residuos de cultivos. La variación en las composiciones químicas se puede deber a diversos factores tales como las especies, el suelo, el estado de madurez y la cosecha (Singh *et al.* 2005). Los resultados del presente experimento confirmaron, previas suposiciones, de que los taninos extraídos (Roth *et al.* 2002), así como las leguminosas ricas en taninos, pueden ser útiles al limitar las emisiones de metano, pero cuando se usan taninos en forma de leguminosas muy ricas en taninos, una disminución simultánea del valor alimentario de la dieta puede cuestionar la viabilidad de esta medición alimentaria. Las

Tabla 1. Composición química de algunas especies de leguminosas cosechadas en etapa de floración

	CO	DP	CPW	A	LTC	LA	LCV	
	$\bar{x} \pm EEM$	$\bar{x} \pm EEM$	$\bar{x} \pm EEM$	$\bar{x} \pm EEM$	$\bar{x} \pm EEM$	$\bar{x} \pm EEM$	$\bar{x} \pm EEM$	Sig.
PB, %	16.63±0.13 <sup>b</sup>	14.38±0.13 <sup>dc</sup>	19.28±0.28 <sup>a</sup>	13.22±0.04 <sup>d</sup>	15.94±0.07 <sup>b</sup>	13.75±0.18 <sup>dc</sup>	14.59±0.84 <sup>c</sup>	**
CSA, %	4.87±0.15 <sup>a</sup>	2.15±0.04 <sup>e</sup>	4.29±0.08 <sup>b</sup>	2.81±0.12 <sup>d</sup>	3.25±0.03 <sup>c</sup>	2.54±0.01 <sup>d</sup>	3.22±0.05 <sup>c</sup>	**
MS, %	90.38±0.08 <sup>e</sup>	92.76±0.15 <sup>a</sup>	92.18±0.05 <sup>b</sup>	91.60±0.08 <sup>c</sup>	91.60±0.08 <sup>c</sup>	91.07±0.13 <sup>d</sup>	92.83±0.13 <sup>a</sup>	**
Cenizas, %	12.08±0.13 <sup>b</sup>	6.25±0.04 <sup>f</sup>	8.94±0.02 <sup>c</sup>	7.51±0.05 <sup>d</sup>	13.02±0.10 <sup>a</sup>	6.83±0.09 <sup>e</sup>	12.38±0.27 <sup>b</sup>	**
FND, %	34.39±0.36 <sup>de</sup>	46.64±0.46 <sup>a</sup>	35.50±0.52 <sup>d</sup>	40.11±0.74 <sup>b</sup>	33.17±0.13 <sup>e</sup>	37.87±0.52 <sup>c</sup>	35.90±0.10 <sup>d</sup>	**
FAD, %	31.16±0.55 <sup>c</sup>	43.16±0.93 <sup>a</sup>	29.51±0.01 <sup>c</sup>	30.14±0.13 <sup>c</sup>	26.61±0.31 <sup>d</sup>	36.91±0.82 <sup>b</sup>	36.91±0.82 <sup>b</sup>	**

$\bar{x}$ : promedio; EEM: error estándar de la medias; MS: materia seca; PB, proteína bruta; FND, fibra neutro detergente; FAD, fibra ácido detergente; CSA: carbohidrato soluble en agua. \*\* (P < 0.01)

características químicas de los forrajes de leguminosas evaluados en el ensayo *in vitro* se presentan en la tabla 2. DP tuvo el mayor contenido de taninos condensados, mientras A tuvo el menor. Las variaciones en el contenido de taninos puede deberse a diferentes reacciones de los taninos u otros compuestos en las leguminosas forrajeras. Los estudios de nutrición de rumiantes con especies de leguminosas han indicado un contenido óptimo de TC en el forraje de 22 g TC MS, mientras el rango de 60-100 g TC g/kg MS disminuye el consumo y el crecimiento (Barry *et al.* 1986). Por lo tanto, el contenido de TC de las leguminosas en este estudio debe ser beneficioso cuando se incluyen en las dietas para rumiantes. Las características del fluido ruminal y la producción de metano de las leguminosas forrajeras evaluadas en el ensayo ruminal *in vitro* se presentan en la tabla 2.

La tabla 2 muestra los efectos de los taninos condensados en la fermentación microbiana después de 144 h de incubación. El N amoniacal decreció ( $P < 0.01$ ) debido al contenido de taninos condensados en las leguminosas forrajeras. La concentración total de AGV no cambió dependiendo de que la concentración de taninos condensados se incrementó de 44.25 a 52.76 mM. La concentración total de AGV decreció numéricamente en dependencia de taninos condensados en las leguminosas forrajeras. La proporción molar de acetato y las proporciones molares de propionato permanecieron invariables en todas las leguminosas forrajeras. Hubo correlación negativa en los TC entre la producción de gas metano, el gas dióxido de carbono, y la producción total de gas. La correlación entre el cambio en la producción de gas en la presencia de taninos

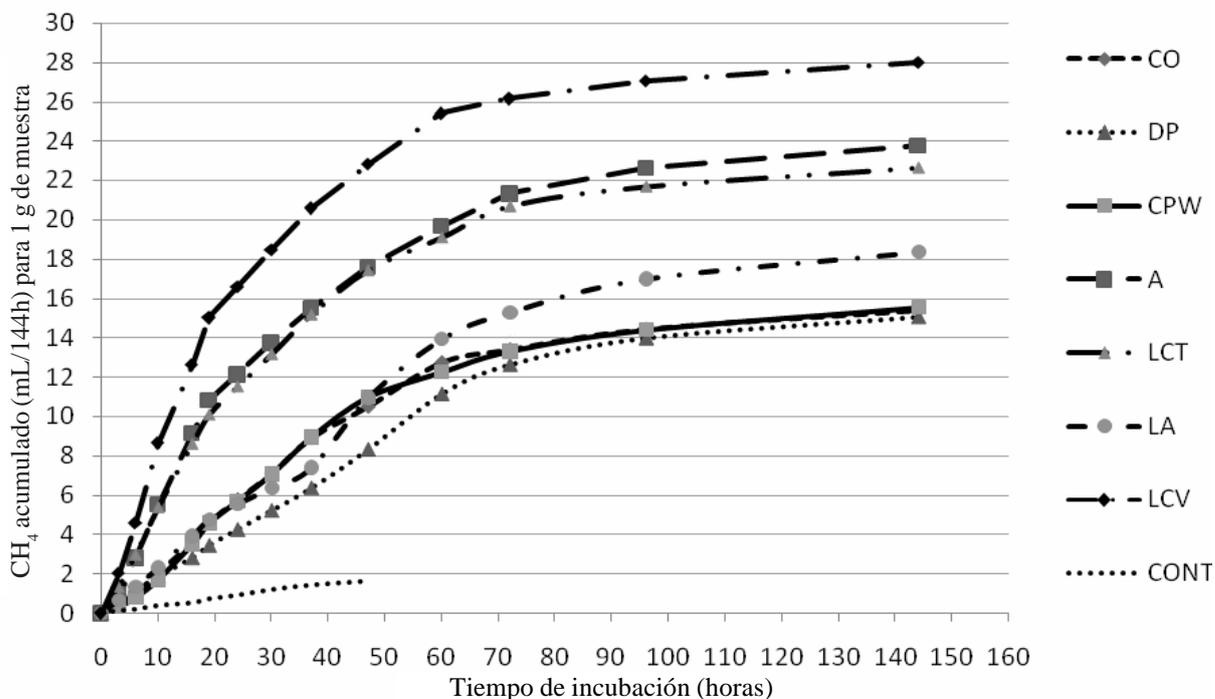
Tabla.2 Ácidos grasos volátiles ruminales, N amoniacal, metano, dióxido de carbono y producción de gas total en especies de leguminosas

	CO	DP	CPW	A	LTC	LA	LCV	Sig.
	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	$\bar{x} \pm \text{EEM}$	
Gas total (mL)(144 h)	242.00±8.00 <sup>b</sup>	190.50±0.50 <sup>c</sup>	237.00±5.00 <sup>b</sup>	269.00±12.00 <sup>a</sup>	238.50±0.50 <sup>b</sup>	193.00±0.00 <sup>c</sup>	270.00±1.00 <sup>a</sup>	***
Metano (mL) (144 h)	15.41±1.31 <sup>d</sup>	15.07±0.35 <sup>d</sup>	15.51±0.10 <sup>d</sup>	23.73±0.50 <sup>b</sup>	22.66±0.40 <sup>b</sup>	18.32±0.21 <sup>c</sup>	27.98±0.49 <sup>a</sup>	***
CO <sub>2</sub> (mL) (144 h)	184.89±10.41 <sup>bc</sup>	132.00±3.93 <sup>d</sup>	187.86±6.35 <sup>b</sup>	204.26±6.94 <sup>ab</sup>	185.97±0.51 <sup>bc</sup>	166.50±2.38 <sup>c</sup>	210.94±1.44 <sup>a</sup>	***
Taninos condensados, mg/kg	3.78±0.39 <sup>de</sup>	103.78±0.54 <sup>a</sup>	18.41±2.71 <sup>c</sup>	0.75±0.19 <sup>e</sup>	22.19±3.33 <sup>c</sup>	55.58±4.37 <sup>b</sup>	8.97±0.54 <sup>d</sup>	***
pH	7.01±0.03	6.93±0.01	6.93±0.01	6.93±0.01	6.93±0.01	6.93±0.01	6.96±0.03	n.s
NH <sub>3</sub> N, mg/dL	78.40±1.69 <sup>a</sup>	62.73±0.72 <sup>abc</sup>	75.70±11.29 <sup>a</sup>	56.71±0.63 <sup>bc</sup>	68.13±1.38 <sup>ab</sup>	51.65±0.58 <sup>c</sup>	68.67±3.79 <sup>ab</sup>	**
AGV totales (mM)	52.23±0.88	44.24±0.32	49.70±2.44	51.42±0.36	49.65±1.18	44.86±1.69	52.76±5.25	n.s
VFA (mM)								
Acético (A)	32.59±0.26	29.82±0.41	31.43±1.71	34.37±0.34	32.65±0.90	30.79±1.14	34.77±3.61	n.s
Propiónico (P)	10.90±0.20	9.33±0.04	10.43±0.46	10.37±0.03	9.98±0.27	9.03±0.43	10.95±1.12	n.s
i-butilato (i-B)	0.79±0.08 <sup>a</sup>	0.53±0.01 <sup>c</sup>	0.67±0.02 <sup>ab</sup>	0.55±0.00 <sup>bc</sup>	0.57±0.00 <sup>bc</sup>	0.44±0.00 <sup>c</sup>	0.67±0.04 <sup>ac</sup>	**
n-butilato (n-B)	5.64±0.18 <sup>a</sup>	2.91±0.09 <sup>c</sup>	4.61±0.18 <sup>b</sup>	4.45±0.02 <sup>b</sup>	4.29±0.00 <sup>b</sup>	3.29±0.07 <sup>c</sup>	4.19±0.30 <sup>b</sup>	***
i-valerato (i-V)	1.16±0.05 <sup>a</sup>	0.85±0.05 <sup>cd</sup>	1.02±0.02 <sup>ab</sup>	0.91±0.03 <sup>bc</sup>	1.02±0.01 <sup>ab</sup>	0.74±0.01 <sup>d</sup>	1.10±0.09 <sup>a</sup>	**
n-valerato (n-V)	1.17±.12 <sup>b</sup>	0.81±0.02 <sup>c</sup>	1.56±0.07 <sup>a</sup>	0.77±0.01 <sup>c</sup>	1.14±0.00 <sup>b</sup>	0.60±0.03 <sup>c</sup>	1.09±0.09 <sup>b</sup>	***
Proporción A/P	2.99±0.03 <sup>d</sup>	3.20±0.03 <sup>c</sup>	3.01±0.03 <sup>d</sup>	3.32±0.04 <sup>ab</sup>	3.26±0.01 <sup>bc</sup>	3.42±0.04 <sup>a</sup>	3.18±0.01 <sup>c</sup>	***

ns: no significativo; \*\*( $P < 0.01$ ); \*\*\*( $P < 0.001$ );  $\bar{x}$ : promedio; EEM: error estándar de las medias

En este estudio con incubaciones *in vitro* de fluido ruminal con siete leguminosas forrajeras por más de 144 h, el volumen de CH<sub>4</sub> acumulado fue 44 % menor para DP comparado con LCW (15.28 mL versus 27.98 mL para equivalente MS,  $P < 0.001$ ). La producción total de gas, metano y dióxido de carbono se incrementó ( $P < 0.001$ ) en cantidad de manera dependiente de los taninos condensados en las leguminosas forrajeras. El incrementar la concentración de taninos condensados resultó en un decrecimiento lineal parcialmente ( $P < 0.001$ ) en la producción de metano, dióxido de carbono y gas total (figura 1).

condensados de forrajes de leguminosas fue consistente con los de Tolera *et al.* (1997). La correlación negativa TC y producción de gas metano ( $r^2 = -0.882$ ); producción de gas dióxido de carbono, producción total de gas ( $r^2 = -0.883$ ); ( $r^2 = -0.867$ ) observada en este estudio y las reportadas por otros (Gurbuz *et al.* 2008 y Abdulrazak *et al.* 2000) pudieran deberse a un efecto de la metanogénesis, la variación estructural y de actividad biológica de los taninos. El volumen acumulado de CH<sub>4</sub> a las 144 h, la tasa de producción de CH<sub>4</sub> para los siete forrajes y el efecto de los taninos condensados en las emisiones de metano se presentan en la figura 1, donde están



Figural. Efectos en la emisión de gas metano de contenido de taninos condensados en algunas leguminosas CO, *Coronilla orientalis*; CPW, *Coronilla parviflora*; DP, *Dorycnium pentaphyllum*; A, *Arygrolobium*; LCT, *Lotus corniculatus* Trabzon; LCV, *Lotus corniculatus vartenofolius*; LA, *Lotus Langustissimus*. Cont, Control (fluido ruminal sin muestra de forraje)

las diferentes tasas de producción de CH<sub>4</sub> para las cantidades de taninos condensados.

El *Dorycnium pentaphyllum* (DP) tuvo la menor cantidad de gas metano y gas dióxido de carbono (15.28, 132 mL/144 h), respectivamente, probablemente en dependencia de la presencia de la mayor cantidad de TC. Los taninos condensados disminuyeron la producción de gas metano y dióxido de carbono en DP, CPW, y LA (P < 0.01), pero no en LCV, LCT y A (figura 1), demostrado por DP, LWC y LA incluyendo los taninos condensados, que representan una menor tasa de producción de CH<sub>4</sub> para LCV, LCT y A, incluyendo el menor contenido de taninos condensados (P < 0.01). No obstante, no hubo efecto discernible de los taninos condensados en el CO, como se muestra por similares pendientes para DP, CPW y LA (figura 1).

La producción acumulada de CH<sub>4</sub> no difirió entre CO, DP y CPW, lo que apoya el argumento de que los TC tuvieron un efecto directo o indirecto en la metanogénesis. La tasa de CH<sub>4</sub> acumulado hasta la tasa de volumen de gas total acumulado no cambió en el tiempo y los efectos de los TC en la producción relativa (es decir, % de volumen total) de CH<sub>4</sub>. El valor de la proteína entre las leguminosas estuvo dentro de los rangos reportados (Bamikole *et al.* 2004). Muchos estudios han mostrado que en alimentos fibrosos y en las leguminosas, PB no puede considerarse como una fracción uniforme puesto que algo de nitrógeno puede encontrarse ya sea como nitrógeno no-proteico soluble o enlazado a paredes celulares (Shayo y Uden 1999). Las emisiones de CH<sub>4</sub> *in vitro* indicaron que los TC disminuyen el número o la actividad de los microorganismos fibrolíticos, las

alteraciones en la actividad de los protozoos pudo haber sido importante. Los metanógenos ruminales se asocian a menudo con protozoos intracelulares y/o se adhieren a la superficie externa de la célula, presumiblemente con transferencia de H<sub>2</sub> inter-especies (Krumholz *et al.* 1983 y Finlay *et al.* 1994). Schönhusen *et al.* (2003) informaron que la emisión de CH<sub>4</sub> ruminal aumentó exponencialmente cuando se incremento el tamaño de la población de protozoos ruminales. Newbold *et al.* (1995) observaron que las bacterias metanogénicas asociadas a los ciliados ruminales explicaban 0.09-0.25 de la metanogénesis del fluido ruminal. Por lo tanto, los cambios en los números de protozoos ruminales con el forraje que contiene TC en este estudio implican que los suministros de sustratos a los metanógenos pueden ser en parte responsables de la emisión reducida de CH<sub>4</sub>. Hay informes que indican decrecimiento en la emisión de CH<sub>4</sub> con la adición en la dieta de TC o la inclusión de de forraje que contiene TC (Carulla *et al.* 2005 y Puchala *et al.* 2005) como en este estudio, pero factores responsables de los efectos de los TC en las emisiones de CH<sub>4</sub> no están todavía claros. Los efectos negativos en la digestión ruminal de fibra, que pudieran estar relacionados con el reducido número de bacterias celulolíticas (McSweeney *et al.* 2001), la formación de complejos de TC-celulosa que son resistentes a digestión enzimática (Makkar *et al.* 1995), y/o la adhesión de sustrato disminuida por los microorganismos fibrolíticos podrían reducir la disponibilidad de H<sub>2</sub> para disminuir la metanogénesis (Carulla *et al.* 2005). El ácido acético, el ácido butírico, el pH y los AGV totales permanecieron invariables en todas las especies de leguminosas. La

proporción molar de i-butilato, n-butilato, i-valerato, n-valerato permaneció invariable ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). La proporción molar de butirato y valerato disminuyó y los taninos condensados aumentaron ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, la fermentación de varios carbohidratos solubles por los microorganismos ruminales (Czerkawski 1969) ha demostrado que la producción de  $\text{CH}_4$  está relacionada con la tasa de fermentación de carbohidratos. Las leguminosas, tales como CO, han mostrado que disminuyen la producción de  $\text{CH}_4$  (Kume 2002, Gurbuz *et al.* 2008, Delgado *et al.* 2007 y González *et al.* 2007), un efecto atribuido a su baja FND y alto contenido de PB. Las leguminosas y arbustos que contienen TC, así como otros forrajes de climas templados y tropicales han sido estudiados por su habilidad de inhibir la producción ruminal de  $\text{CH}_4$ .

Barahona *et al.* (2003) completaron incubaciones *in vitro* con hojas de leguminosas forrajeras tropicales que difirieron en contenido y composición de TC y polisacáridos no almidonados, y evaluaron las relaciones entre la PB, los TC y el contenido de carbohidratos de las paredes celulares. Estudios de los efectos de la inclusión dietética de leguminosas en la emisión entérica de  $\text{CH}_4$  han producido resultados contradictorios. Mbanzamihiyo *et al.* (2002) no encontraron efecto de la proporción de leguminosa dietética. Además, cuando se expresó como relativa a la MO digerida y a la FND, la emisión de  $\text{CH}_4$  fue mayor para las dietas que contenían leguminosas. McCaughey *et al.* (1999) informaron menor rendimiento de  $\text{CH}_4$  en ganado bovino en pastoreo de gramínea-alfalfa versus ganado en pastoreo gramíneas. Los factores responsables de las diferencias entre los hallazgos no están claros, pero se pudieran incluir la variación en la composición química de las leguminosas y las gramíneas y la actividad microbiana asociada y la tasa de flujo de la digesta desde el rumen (Pinares-Patiño *et al.* 2003). Las mayores concentraciones de los AGV de cadena se observaron en las leguminosas no tanníferas tales como LA y A, mientras que las menores concentraciones se presentaron en algunas de las leguminosas con alto contenido de TC. La presencia de los TC se encontró que fue mejor relacionada con la reducción de la tasa inicial de la producción de gas, más que con la cantidad final de gas producido o el alcance de la degradación de MS.

En las condiciones *in vitro* del forraje de este estudio después del período de 144h, el volumen acumulado de  $\text{CH}_4$  para DP fue el menor de todas las leguminosas, un incremento en la acumulación de  $\text{CH}_4$  de contenido de taninos condensados ( $P < 0.01$ ). Las leguminosas con alto contenido de taninos condensados se han evaluado para efectos en la metanogénesis ruminal en cultivo continuo (Broudiscou *et al.* 2000). Los AGV ruminales y la producción *in vitro* de  $\text{CH}_4$  se correlaciona fuertemente con la proporción de  $\text{C}_2$  a  $\text{C}_3$ , que depende del pH y del sustrato (Russell 2002). La estrecha relación inversa entre la proporción molar de  $\text{C}_3$  y la producción

de  $\text{CH}_4$  puede ser predicha a partir de la interacción entre la población microbiana ruminal y los compuestos que propician la alta producción de  $\text{C}_3$  que declina la producción de  $\text{CH}_4$  ya que el incremento de  $\text{C}_3$  puede estar asociado al incremento del flujo de proteína desde el rumen. La evaluación o recolección de compuestos efectivos para disminuir la producción de  $\text{CH}_4$  deben incluir los efectos en la productividad animal (Baker 1999). Sin embargo, las leguminosas de bajo contenido de taninos condensados incrementaron ( $P < 0.01$ ) la producción total de AGV en LCW y cambiaron las proporciones molares a favor de  $\text{C}_3$ . Este cambio en la producción de AGV y la acumulación de  $\text{CH}_4$  en el contenido de taninos condensados en algunas leguminosas sugirió que los TC inhiben tanto la metanogénesis como la fermentación de materia orgánica. También, el contenido de taninos en las leguminosas disminuyó la liberación de metano relativa a la DMO (Gurbuz *et al.* 2008). Puesto que el contenido de taninos condensados influyó en la liberación diaria de metano en forma similar a como afectó la digestibilidad de la MO, la inhibición de la metanogénesis por los taninos se debió probablemente al resultado de la supresión de la degradación de la fibra. No obstante, un efecto directo de los taninos condensados en los metanógenos ruminales no puede excluirse del todo (Field *et al.* 1989). Además, los taninos redujeron la degradación de nutrientes en el rumen, lo que por lo tanto podrían ser degradados en el intestino. Esto pudiera haber contribuido con una menor emisión de metano también porque la fermentación en el intestino difiere de la fermentación ruminal resultando en menor producción de metano por unidad de nutrientes fermentados (Fievez *et al.* 1999). Las variaciones en la producción de metano observada entre las especies de leguminosas estuvieron relacionadas con el contenido de taninos condensados y la calidad del forraje que afecta la digestibilidad. Estos resultados sugieren que en particular los taninos condensados disminuyeron las emisiones de metano en leguminosas con taninos como *Dorycnium pentaphyllum*, a pesar de ser también efectivas en limitar la metanogénesis.

Esta investigación es parte de un programa que busca la identificación de posibles plantas forrajeras para  $\text{CH}_4$  en la agricultura. Los resultados con siete leguminosas forrajeras indicaron que inactivar los TC mediante la adición de contenidos de taninos condensados disminuye la producción de  $\text{CH}_4$ , lo que pudiera ser el resultado de una degradación de fibra incrementada y no enteramente por una inhibición directa de los metanógenos. No obstante, solo una porción del decrecimiento de  $\text{CH}_4$  puede explicarse por la acción de los TC en los productores de  $\text{CH}_4$  y la inhibición residual parece ser una inhibición directa de los metanógenos. El forraje que contiene TC tal como el DP reduce la emisión de  $\text{CH}_4$  en el fluido ruminal. Parece que los TC son responsables de la mayor parte de este efecto, aunque pueden haber también influencias del tipo de forraje (es decir la leguminosa).

Los resultados de la producción de metano y la medición de otros fluidos ruminales probablemente reflejen los niveles dietéticos diferentes de TC, así como variaciones entre plantas en la actividad biológica de TC (Min *et al.* 2003). Estos resultados sugieren el potencial de los taninos condensados en forrajes tales como las especies de *Lotus* para minimizar la emisión de metano por los rumiantes. El desarrollo de las estrategias de manejo para mitigar las emisiones de metano del ganado vacuno es posible y deseable. No solo la utilización aumentada de carbono dietético mejorará la eficiencia alimenticia y la productividad animal, sino que una disminución de las emisiones de metano reducirá la contribución de los rumiantes al contenido global de metano.

### Agradecimientos

El autor agradece al personal académico (especialmente al Dr. David Richard Davies y David Leemans) y al personal técnico del Instituto de de Ciencias Biológicas, Medioambientales y Rurales, del Reino Unido, por los ensayos experimentales, químicos, de compuestos fenólicos, de digestibilidad y de análisis de emisión de metano.

### Referencias

- Abdulrazak, S.A., Fujihara, T., Ondiek, T. & Ørskov, E.R. 2000. Nutritive evaluation of some Acacia from Kenya. *Anim. Feed Sci. Tech.* 85:89
- AOAC 1995. Official methods of analysis. 16<sup>th</sup> Ed. The Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA
- Baker, S.K. 1999. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.* 50:1293
- Bakshi, M.P.S. & Wadhwa, M. 2004. Evaluation of forest tree leaves of semi-hilly arid region as livestock feed. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 17:777
- Bamikole, M.A., Akinsoyinu, A.O., Ezenwa, I., Babayemi, O.J., Akinlade, J. & Adewumi, M.K. 2004. Effect of 6 weekly harvests on the yield, chemical composition and dry matter degradability of *Panicum maximum* and *Stylosanthes hamata* in Nigeria. *Grass Forage Sci.* 59:357
- Barahona, R., Lascano, C.E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P. & Theodorou, M.K. 2003. *In vitro* degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *J. Sci. Food Agric.* 83:1256
- Barry, T.N., Manley, T.R. & Duncan, S.J. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br. J. Nutr.* 55:123
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:21
- Bremner, J.M. & Keeney, D.R. 1965. Steam distilled methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chim. Acta* 32:485
- Broudiscou P., Papon, Y. & Broudiscou, A.F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87:263
- Carter, E.B., Theodorou, M.K. & Morris, P. 1997. Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. 1. Effects of elevated CO<sub>2</sub>, temperature and drought on growth and plant development. *New Phytol.* 136:245
- Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmiller, A. & Hess, H.D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 56:961
- Clark, H. 2002. Ruminant methane emission measurement and estimates—from gut to globe. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 206–210
- Czerkawski, J.W. 1969. Methane production in ruminants and its significance. *World Rev. Nutr. Dietetics* 11:240
- Delgado, D.C., González, R., Galindo, J., Cairo, J. & Almeida, M. 2007. Potencialidad de *Trichantera gigantea* y *Morus alba* para reducir la producción ruminal de metano *in vitro*. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 41:339
- Douglas, G.B., Stienezen, M., Waghorn, G.C. & Foote, A.G. 1999. Effect of condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on body weight, carcass fat depth, and wool growth of lamb in New Zealand. *N.Z. J. Agric. Res.* 42:55
- Dube, J.S. 1993. Nutritive value of 4 species of browse proffered by indigenous goat in a resoil thornveld in Southern Zimbabwe. M Phil Thesis, University of Zimbabwe, Zimbabwe
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1
- Field, J.A., Kortekaas, S. & Lettinga, G. 1989. The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biol. Wastes* 29:241
- Fievez, V., Piattoni, F., Mbanzamihiyo, L. & Demeyer, D. 1999. Reductive acetogenesis in the hindgut and attempts to its reduction in the rumen—a review. *J. Appl. Anim. Res.* 16:1
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M. & Hirt, R.P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 117:157
- González, R., Delgado, D.C. & Cairo, J. 2007. Efecto de la inclusión de *Sapindus saponaria* en la producción de gas y metano en la fermentación *in vitro* de *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 41:39
- Gurbuz, Y., Kaplan, M. & Davies, D.R. 2008. Effects of condensed tannin content on digestibility and determination of nutritive value of selected some native legumes species. *J. Anim. Vet. Adv.* 7:854
- Haddi, M.L., Filacorda, S., Meniai, K., Rollin, F. & Susmel, P. 2003. *In vitro* fermentation kinetics of some halophyte shrubs sampled at three stages of maturity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104:215
- Hagerman, A.E. & Butler, L.G. 1980. Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins. *J. Agric. Food Chem.* 28:947
- Hassan, S.M., Lahlou Kassi, A., Newbold, C.J. & Wallace, R.J. 2000. Chemical composition and degradation characteristics of foliage of African multipurpose trees. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:27
- Hegarty, R.S. 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.* 50:1299
- Johnson, K.A. & Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483

- Kume, S., 2002. En: Takahashi, J., Young, B.A. (Eds.), Establishment of Profitable Dairy Farming System on Control of Methane Production in Hokkaido Region in Greenhouse Gases and Animal Agriculture. Elsevier Science, Obihiro, Japan, p. 87
- Krumholz, L.R., Forsberg, C.W. & Veira, D.M. 1983. Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Can. J. Microbiol.* 29:676
- Makkar, H.P.S., Blummel, M. & Becker, K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implications in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br. J. Nutr.* 73:897
- Mathison, G.W., Okine, E.K., McAllister, T.A., Dong, Y., Galbraith, J. & Dmytruk, O.I.N. 1998. Reducing methane emissions from ruminant animals. *J. Appl. Anim. Res.* 14:1
- Mbanzamihiho, L., Fievez, V., da Costa Gomez, C., Piattoni, F., Carlier, L. & Demeyer, D. 2002. Methane emission from the rumen of sheep fed a mixed grass-clover pasture at two fertilisation rates in early and late season. *Can. J. Anim. Sci.* 82:69
- McCaughy, W.P., Wittenberg, K. & Corrigan, D. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can. J. Anim. Sci.* 79:221
- McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R. & Krause, D.O. 2001. Effect of tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90:78
- Menke, K.H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. & McNabb, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:3
- Minson, D.J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA.
- Moss, A.R. 1993. Methane-global warming and production by animals, Chalcombe Publications, Canterbury, UK. 105pp.
- Newbold, C.J., Lassalas B. & Jouany, J.P. 1995. The importance of methanogenesis associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letters Appl. Microbiol.* 21:230
- Norton, B.W. 1994. Anti-nutritive and toxic factors in forage tree legumes. En: Forage tree legumes intropical agriculture. Eds. Gutteridge, R.G. and Shelton, H.M. CAB, London. Int., Wallingford, Oxon, UK., pp. 202-215
- Ørskov, E.R. & McDonald, 1979. The estimation of protein degradation in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499
- Osuga, I.M., Abdulrazak, S.A., Ichinohe, T. & Fujihara, T. 2005. Chemical composition, degradation characteristics and effect of tannin on digestibility of some browse species from Kenya harvested during the wet season. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 18:54
- Pen, B. 2007. Studies on manipulation of ruminal fermentation and methanogenesis by natural products. Ph.D. Thesis. The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University Japan
- Pinares-Patiño, C.S., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Barry, T.N. & Holmes, C.W. 2003. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J. Agric. Sci.* 140:205
- Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L. & Sahlu, T. 2005 The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J. Anim. Sci.* 83:182
- Roth, S., Steingass, H. & Drochner, W. 2002. Minderung von Methanemissionen und Optimierung der N-Versorgung bei Wiederkäuern durch die Behandlung von Futtermitteln mit Tanninen. En: R. Böcker (Ed.), Hohenheimer Umweltsymposium, Verlag Günter Heimbach, Stuttgart. pp. 181-186
- Russell, J.B. 1998. The importance of pH on the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 81:3222
- Russell, J.B. 2002, Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition, Ithaca, NY, USA (2002). Zadravec-Erjavec Days, Radenci, Slovenia
- SAS 1999. SAS User's Guide. SAS Institute Inc. Version 8.02. Cary, NC, USA.
- Schönhusen, U., Zitnan, R., Kuhla, S., Jentsch, W., Derno, M. & Voigt, J. 2003, Effects of protozoa on methane production in rumen and hindgut of calves around time of weaning. *Arch. Anim. Nutr.* 57:279
- Shayo, C.M. & Uden, P. 1999. Nutritional uniformity of crude protein fraction in some tropical browse plants estimated by two *in vitro* methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:141
- Singh, B., Sahoo, A., Sharma, R. & Bhat, T.K. 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:351
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.D. & Barry, T.N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mcallan, A.B. & 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
- Thomas, T.A. 1977. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. *J. Sci. Food Agric.* 28:639
- Tolera, A., Khazaal, K. & Orskov, E.R. 1997. Nutritive evaluation of some browses species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:181
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. Methods of fiber, neutral detergent fiber and nonstarch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583
- Waghorn, G.C., Tavendale, M.H. & Woodfield, D.R. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proc. N.Z. Grassl. Assoc.* 64:167
- Woodward, S.I., Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J. & Lassey, K.R. 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 61:23
- Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., Longland, A.C., Nielson, B.B., Dijkstra, J. & Trinci, A.P.J. 1996. Growth and survival of anaerobic fungi in batch and continuous-flow cultures. *Anaerobe* 2:29