



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

EFFECTO EN LA FERMENTACION RUMINAL *IN VITRO*
DE DIETAS UTILIZADAS PARA GANADO LECHERO,
ADICIONADAS CON ESPECIES ALTAS EN TANINOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

BEATRIZ MATÍAS GONZÁLEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca. Estado de México. Octubre 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

EFFECTO EN LA FERMENTACION RUMINAL *IN VITRO*
DE DIETAS UTILIZADAS PARA GANADO LECHERO,
ADICIONADAS CON ESPECIES ALTAS EN TANINOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

BEATRIZ MATÍAS GONZÁLEZ

COMITÉ TUTORAL

Dra. JULIETA G. ESTRADA FLORES. Tutora Académica
Ph. D. OCTAVIO A. CASTELÁN ORTEGA. Tutor Adjunto
Dr. MANUEL GONZÁLEZ RONQUILLO. Tutor Adjunto

El cerrillo Piedras Blancas. Toluca. Estado de México. Octubre 2013

RESUMEN

En los últimos años las investigaciones en nutrición de rumiantes han promovido el uso de plantas forrajeras nativas, silvestres o cultivadas como suplemento por su mayor contenido de proteína; sin embargo, estas pueden contener metabolitos secundarios con importancia antimicrobial, ya que pueden modificar la fermentación ruminal y aumentar la eficiencia de la utilización de los forrajes, entre estos compuestos secundarios se encuentran los taninos. El objetivo del presente estudio, fue evaluar el efecto de los taninos sobre la cinética de fermentación ruminal en una dieta base con especies taníferas (*C. sulphureus*, *C. bipinnatus*, *T. lucida*, *T. erecta*, *M. divaricatum* y *M. diplotricha*). Se realizaron dos experimentos; el primero para comprobar el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal, se utilizó polyethylene glycol (PEG) como bloqueador de taninos, y el segundo experimento consistió en evaluar una dieta base, adicionada con tres niveles de inclusión (alto, medio y bajo) de extracto de las especies taníferas (de manera individual). En ambos experimentos se utilizó un diseño de bloques al azar, donde las variables evaluadas fueron los parámetros de la cinética de fermentación ruminal, digestibilidad de la materia seca (dMS), materia orgánica (dMO), fibra detergente neutro (dNDF) y energía metabolizable (EM). Al adicionar PEG a las especies taníferas se observaron diferencias ($p < 0.05$) a las 24 y 96 h de fermentación entre tratamientos (+PEG, -PEG) y entre especies al incrementar la producción de gas mejorando la dNDF y el aporte de EM (entre tratamientos), la dMS, dMO, dNDF y EM (entre especies), ya que mejoraron al adicionar PEG; mientras que, los parámetros de la cinética de fermentación ruminal no presentaron diferencias ($p > 0.05$). Al adicionar tres niveles (alto, medio y bajo) de inclusión de extracto de taninos a una dieta base no hubo diferencias ($P > 0.05$) en los parámetros de la cinética de fermentación, la dMS, dMO, dNDF y EM., y entre especies únicamente hubo diferencias ($P < 0.05$) en la fracción *b* y la dNDF.; sin embargo, en el nivel de inclusión bajo se observó una mejora en todas las variables evaluadas. La adición de PEG a las especies taníferas demuestra el

efecto negativo de los taninos sobre la fermentación ruminal. En el nivel de inclusión bajo respondieron favorablemente todas las variables evaluadas.

ABSTRACT

In recent years, research studies on ruminant nutrition have promoted the use of native, wild and cultivated forage plants as a feed supplement, due to their high protein content. However, these plants may contain secondary metabolites with a significant antimicrobial effect. They may modify ruminal fermentation and may increase the efficiency of forage use, and tannins are among these secondary compounds. The objective of this study was to evaluate the effect of tannins on ruminal fermentation kinetics in a base diet with tanniferous species (*C. sulphureus*, *C. bipinnatus*, *T. lucida*, *T. erecta*, *M. divaricatum* and *M. diplotricha*). Two experiments were conducted: the first to test the effect of tannins on ruminal fermentation, using polyethylene glycol (PEG) as a tannin blocker, and the second experiment consisted of evaluating a base diet with an extract from tanniferous species added (on an individual basis) with three levels of inclusion (high, medium and low). In both experiments, a random block design was used, and the variables evaluated were ruminal fermentation kinetics parameters; digestibility of dry matter (dDM), of organic matter (dOM) and of neutral detergent fiber (dNDF); and metabolizable energy (ME). With the addition of PEG to the tanniferous species, differences ($p < 0.05$) were observed at 24 and 96 hours of fermentation, between treatments (+PEG, -PEG) and among species, with an increase in gas production, and improvements in the dNDF and the contribution of ME (between treatments), and in the dDM, dOM, dNDF and ME (among species). In the case of ruminal fermentation kinetics parameters, no differences ($p > 0.05$) were noted. When an extract of tannins was added at the three levels of inclusion (high, medium and low) to a base diet, no differences ($p > 0.05$) were noted in fermentation kinetics parameters, in the dDM, dOM, dNDF or the ME. The only differences ($p > 0.05$) observed among species were in fraction *b* and in the dNDF. However, improvements were noted in all the variables evaluated at the low level of inclusion. The addition of PEG to tanniferous species demonstrates the negative

effect of tannins on ruminal fermentation. There was a favorable response in all the variables evaluated at the low level of inclusion.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Autónoma del Estado de México a través del proyecto Determinación de las deficiencias de fermentación ruminal en arvenses y rastrojos de maíz utilizados para la alimentación del ganado lechero en el Valle de Toluca. Financiamiento: UAEMex 2422/2007U.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo 2010-2012.

Se agradece el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca otorgada para la culminación de este trabajo bajo la clave 11BTM0256.

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México por el apoyo y material brindados para lograr que fuera posible este proyecto.

A la Dra. Julieta G. Estrada Flores por su apoyo, paciencia y por su acertada dirección para la realización de este proyecto y por su amistad.

Al Ph. D. Octavio A. Castelán Ortega y al Dr. Manuel González Ronquillo por sus acertadas sugerencias, comentarios y sobre todo por su paciencia durante la realización de este importante proyecto.

Al Dr. Abdel Fattah Salem por su apoyo la segunda parte del experimento.

A Marisol, Brenda, Lulú y Laura por su apoyo en laboratorio.

“Sera como árbol plantado junto a las aguas. Y no vera cuando viene el calor, sino que su hoja estará verde”

Jer 17:8

A Dios

En memoria de mi Padre (q.e.p.d.)

Y a mi Madre.

Gracias porque sin su luz, no hubiera podido

“Si las semillas sembradas en la tierra negra pueden llegar a convertirse en rosas tan bellas. ¿Qué no puede llegar a ser el corazón del hombre en su largo camino hacia las estrellas”

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Fisiología del rumen	2
2.2. Población microbiana ruminal.....	4
2.3. Fermentación ruminal.....	6
2.4. Metabólitos secundarios en plantas.....	7
2.5. Importancia de taninos en rumiantes.....	10
2.6. Técnicas de producción de gas <i>in vitro</i>	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	15
V. HIPÓTESIS	16
VI. OBJETIVOS	17
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 Selección de las especies taníferas.....	18
7.2 Determinación de metabólitos secundarios	19
7.3 Análisis químico proximal.....	19
7.4 Efecto del Polietilen glicol (PEG) sobre la fermentación ruminal con especies abundantes en taninos.	20
7.5 Efecto en la fermentación ruminal de tres niveles de inclusión de extracto de taninos en una dieta base para ganado lechero.....	20
7.6 Cálculos.....	21
7.7 Diseño experimental.....	23
7.8. Análisis estadístico	24
VIII. RESULTADOS.....	25

8.1 Carta de recepción de artículo.....	25
8.2 Artículo enviado	26
IX. CONCLUSIÓN GENERAL.....	61
X. LITERATURA CITADA.....	62
XI. ANEXOS.....	71

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años las investigaciones en nutrición de rumiantes han promovido el uso de plantas forrajeras nativas, silvestres o cultivadas como suplemento por su alto contenido de proteína (Moreno-Murillo *et al.*, 2006). Sin embargo, estos pueden contener metabolitos secundarios (MSec) con importancia antimicrobial, ya que pueden modificar la fermentación ruminal y aumentar la eficiencia de la utilización de los forrajes (Greathead, 2003). Entre estos compuestos secundarios se encuentran los taninos (Makkar, 2007).

Los taninos condensados, a altas concentraciones afectan a los rumiantes; mientras que, a bajas concentraciones los benefician (Torres-Acosta *et al.* 2008). Un efecto positivo sucede cuando el tanino protege la proteína vegetal (complejo tanino-proteína) de la degradación microbiana en rumen, para posteriormente romperse en el abomaso, dándose así una absorción de nitrógeno en el intestino (Givens *et al.*, 2000), además suelen reducir la emisión de metano (Tiemann *et al.*, 2006b), tienen un efecto antihelmíntico (Salem *et al.*, 2012) y antitimpánico (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Los efectos negativos se manifiestan con niveles altos de taninos condensados reduciendo la digestibilidad de los forrajes, la producción de ácidos grasos volátiles (Pinto-Ruiz *et al.*, 2009) y el desempeño animal, esto depende de la cantidad y la actividad biológica de los taninos presentes (Shofield, 2001; Tiemann *et al.*, 2006b). Recientemente, se ha sugerido que el efecto negativo de los taninos presentes en algunos forrajes puede disminuir si este es consumido en bajas cantidades y mezclados con otros forrajes (Ramírez, 2009).

Con estos estudios aún no es claro el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal, Clausen *et al.* (1990) menciona que los taninos condensados de diferentes especies vegetales poseen propiedades físicas y químicas que marcan variaciones en cuanto a un posible efecto en los rumiantes.

II. ANTECEDENTES

2.1 Fisiología del rumen

Los rumiantes son los animales que digieren los alimentos en dos etapas; primero los consumen y luego realizan la rumia, poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir el material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva: carne y leche. (Montenegro *et al.*, 2000).

Los rumiantes, como ovejas, vacas, cabras y antílopes tienen un estómago que ocupa casi tres cuartas partes de la cavidad abdominal y está formado por cuatro compartimentos: rumen, retículo, omaso y el abomaso. Estos compartimentos se desarrollan desde el estómago en el estado embrionario y son relativamente pequeños en el animal recién nacido donde el rumen y el retículo juntos apenas son la mitad del abomaso o estómago verdadero (Annison y Lewis, 1986). En cambio, los camellos, las llamas y otras especies relacionadas son consideradas pseudorumiantes, debido a que poseen un estómago dividido en tres compartimentos. El compartimento ausente en estas especies es el omaso (Ramírez, 2003).

El rumen es un pre-estómago complejo de tamaño considerable, y en menor extensión por el ciego y el colon. El crecimiento considerable del rumen se realiza durante los primeros meses de vida, pero se sabe que el elemento principal de su desarrollo es la ingestión de sólidos (Annison y Lewis, 1986). El rumen ocupa más del 70% de la capacidad del estómago y su volumen total es de 15 L en el ganado ovino y en los bovinos entre 100-150 L (Tsuda, 1994). El rumen todavía no es funcional en los animales recién nacidos, pero la fermentación ruminal empieza en unas cuatro semanas. A medida que crece el rumen, va estableciéndose una población mixta de bacterias y protozoos. La fuente de los protozoarios es indudablemente la inoculación cruzada de otros animales, puesto que los rumiantes jóvenes criados en aislamiento carecen de protozoarios del rumen. La

flora bacteriana que se forma una vez que se proporcionan alimentos sólidos debe ser introducida con los alimentos y el agua. El contacto con otros animales resulta la forma más rápida de establecerla con una diversidad mayor de organismos, pero no se sabe si esto es ventajoso para el animal (Annison y Lewis, 1986).

El rumen y el retículo anatómicamente son similares, y en general se consideran como un solo compartimento (retículo-rumen), solo los separa el pliegue reticuloruminal; esta separación es parcial, ya que existe libre intercambio de contenido. En estos dos órganos ocurre la mayor actividad de fermentación y absorción de nutrientes. En el animal lactante estos dos órganos están muy poco desarrollados y la leche ingerida pasa directamente al omaso y el abomaso a través de la gotera esofágica. En el momento en que el ternero o el cordero empiezan a comer alimento sólido, estos dos órganos aumentan considerablemente de tamaño. El contenido del rumen está formado por 850 a 930 g de agua/kg MS y normalmente se dispone en dos fases: una inferior líquida en la que van suspendidas las partículas más finas de alimento, y otra superior más seca de materia sólida más gruesa (Ramírez, 2003).

El rumiante crea y mantiene a nivel retículo-ruminal las condiciones ideales para el crecimiento y multiplicación de microorganismos. Las condiciones retículo-ruminales para el desarrollo de estos incluyen:

- a) Aporte de nutrientes. Debe tenerse en cuenta que la nutrición del rumiante depende de la nutrición de su población ruminal. Esta degrada parcial o totalmente los componentes de la dieta, por lo cual puede aceptarse que en realidad se está alimentando al rumen para que luego éste alimente al rumiante.
- b) Anaerobiosis. El metabolismo anaerobio de los microorganismos ruminales es el factor responsable de la simbiosis con el rumiante. Al no utilizar oxígeno los microorganismos ruminales dependen de la vía glucolítica para la obtención de energía.

- c) pH. Cada microorganismo posee un rango de pH óptimo para desarrollarse. La flora normal del rumen desarrolla en un rango de pH de 5.5 a 6.9. Fuera de éste, el pH extremo favorece el desarrollo de otros microorganismos que alteran el patrón metabólico del rumen y enferman al rumiante.
- d) Presión osmótica. El contenido ruminal mantiene una presión osmótica de alrededor de 300 m Osm/lit, para evitar pérdidas desmedidas de agua desde el líquido intersticial hacia el rumen o viceversa.
- e) Temperatura. Es otro de los factores que condicionan el desarrollo bacteriano. Producto de las reacciones químicas dentro del rumen, la temperatura ruminal se mantiene entre 38 y 42 °C.
- f) Potencial redox. En el rumen oscila entre -250 y -450 mV, reflejando la ausencia de oxígeno y el exceso del poder reductor.
- g) Eliminación de los productos de desecho del metabolismo ruminal (Ácidos grasos volátiles [AGV], gases y alimento no digerido). Los AGV e H⁺ deben ser retirados del rumen, de otro modo su acumulación excesiva aumentaría la presión osmótica y disminuiría el pH a valores nocivos. Los AGV son retirados por absorción a través de las paredes del rumen. El H⁺ es eliminado tras la formación de metano. Un bovino produce diariamente cientos de litros de gas, especialmente CO₂ y CH₄, que deben ser eliminados por eructación. La fracción de la dieta que no pudo ser digerida debe continuar su tránsito por el aparato digestivo (Relling *et al.*, 2002)

El abomaso es el verdadero estómago del rumiante, debido a que ahí se lleva a cabo la digestión ácida y parcialmente enzimática de algunos nutrientes, como las proteínas, y se coagula la leche en los rumiantes lactantes (Ramírez, 2003)

2.2. Población microbiana ruminal

La microbiota del rumen mantiene una relación simbiótica verdadera con el huésped, son predominantemente bacterias, protozoos y hongos anaerobios y dependen del rumiante para disponer de las condiciones fisiológicas necesarias para su existencia. A su vez, estos microorganismos son esenciales para la

digestión y fermentación de alimento fibroso que consumen los rumiantes que, de otra manera, no podrían utilizar de una forma eficaz. El rumen proporciona un ambiente ideal para el mantenimiento de una población microbiana. Los alimentos que ingiere el animal proporcionan un aporte constante de sustrato y la gran capacidad del rumen aporta el volumen necesario y el tiempo de retención para que los complejos componentes de la dieta (celulosa y otros polisacáridos) sean degradados y fermentados por los microbios del rumen (Yokoyama y Johnson, 1988).

Las bacterias se encuentran en un número de 10^9 a 10^{10} por ml, y cerca de 60 especies han sido identificadas. El número total de bacterias y la población relativa de especies individuales varía con la dieta de los animales, por ejemplo, dietas ricas en concentrados promueven un alto contenido de la proliferación de lactobacilos (Van Soest, 1994). La mayoría son anaerobios obligados y se encuentran desde bacterias celulolíticas (encargadas de degradar la celulosa), hemicelulolíticas (degradan hemicelulosa), bacterias amilolíticas (degradan almidón), bacterias proteolíticas (degradan proteína), bacterias productoras de amoníaco, y bacterias productoras de metano (Yokoyama y Johnson, 1988).

Los protozoarios están presentes en cantidades mucho menores (10^6 ml) que las bacterias, aunque se descubren especies flageladas, la mayoría son ciliadas (Ramírez, 2003). Se calcula que los protozoos pueden representar el 2% del peso del contenido del rumen, el 40% del N microbiano total y proporcionar el 60% de los productos de la fermentación microbiana en el rumen. Algunos estudios han demostrado que mejoran la digestibilidad, y las ganancias de peso son más rápidas cuando el rumen los contiene (Yokoyama y Johnson, 1988).

En rumen se han descubierto zoosporas de hongos ficomicetos y células vegetativas. Cuando los animales reciben dietas ricas en forrajes, los hongos del rumen pueden aportar el 8% de la masa microbiana. Todavía no se sabe con exactitud si estos hongos son funcionalmente importantes para el rumen, aunque

se ha demostrado que degradan xilanos y celulosas, indicando que tienen al menos cierto papel en la digestión de la fibra (Óp. Cit.).

2.3. Fermentación ruminal

La fermentación en el rumen es el resultado de actividades físicas y microbiológicas que transforman los componentes de la dieta en productos útiles (ácidos grasos volátiles [AGV], proteína microbiana y vitaminas del grupo B), no útiles (CH_4 , CO_2) o incluso nocivos (amoníaco, nitrato) para el animal huésped (Owens y Goetsch, 1988).

El contenido del rumen se mezcla continuamente por las contracciones rítmicas de sus paredes, y durante la rumia la parte más próxima al exterior pasa al esófago y se devuelve a la boca por una onda de contracción. La porción líquida es tragada de nuevo rápidamente, pero el componente sólido se mastica en forma concienzuda antes de pasar de nuevo al rumen. El tiempo que el animal destina a rumiar depende del contenido fibroso del alimento. En bovinos puede ser de 8 h diarias. Cada bolo de alimento regurgitado se mastica unas 40-50 veces mucho más que en el momento de ser comido (Ramírez, 2003).

La dieta del rumiante contiene cantidades considerables de celulosa, hemicelulosa, almidón y carbohidratos hidrosolubles. Todos los carbohidratos excepto la lignina son atacados por los microorganismos del rumen. El rompimiento de los carbohidratos en el rumen se puede dividir en dos etapas, la primera de las cuales es la digestión de los carbohidratos complejos a carbohidratos más simples, y en la segunda etapa, los caminos involucrados son en muchos aspectos similares a aquellos que sigue el metabolismo de los carbohidratos del propio animal. Los principales productos finales del metabolismo de los carbohidratos de los microorganismos del rumen son los ácidos grasos acético, propiónico y butírico, dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), (Ramírez, 2003).

Los microorganismos del rumen hidrolizan las proteínas, los péptidos y los aminoácidos, algunos de los cuales posteriormente se degradan a ácidos orgánicos, amoníaco y CO₂. El amoníaco producido, junto con los péptidos de cadena corta y los aminoácidos libres son utilizados por los microorganismos del rumen para sintetizar sus proteínas, que posteriormente se digieren en el abomaso e intestino delgado. Un aspecto importante de la síntesis de proteína microbiana, es que las bacterias pueden utilizar tanto aminoácidos indispensables como no indispensables, lo que asegura al animal hospedero un aporte de los primeros, independientemente de su contenido en la dieta (Van Soest, 1994). No solo la proteína degradable de origen alimenticio contribuye con amoníaco del rumen, en los alimentos utilizados por los rumiantes el N también se encuentra en forma de compuestos orgánicos simples como aminoácidos, amidas y aminas, o de compuestos inorgánicos como los nitratos; es posible aprovechar la capacidad de los microorganismos del rumen para transformar los compuestos nitrogenados no proteínicos (NNP) en proteínas, mediante la adición de aquellos en la dieta. El compuesto más usado es la urea, pero pueden utilizarse varios derivados de esta (McDonald, 1998).

La síntesis de vitaminas del complejo B y vitamina K pueden llevarla a cabo los microorganismos del rumen. Cuando el alimento es rico en vitaminas del complejo B, la cantidad sintetizada es relativamente pequeña, pero si el aporte alimenticio disminuye, esta cantidad aumenta (McDonald, 1998).

2.4. Metabólitos secundarios en plantas

Los taninos condensados pertenecen a los compuestos secundarios de las plantas, que se definen como los compuestos químicos sintetizados por las plantas y cumplen funciones no esenciales en ellas, no intervienen en el metabolismo primario de las plantas, más bien en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. La mayoría cumple funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer polinizadores (Isaza, 2007).

Hay cerca de 24,000 estructuras, incluyendo muchos compuestos que tienen efectos antinutricionales y tóxicos en mamíferos. Los compuestos secundarios presentes en forrajes incluyen alcaloides, terpenos volátiles, saponinas, ácidos fenólicos, taninos hidrolizables (TH) y flavonoides, incluyendo proantocianidinas (PA). Estudios sobre los compuestos secundarios en forrajes han encontrado que tienen efectos tóxicos y antinutricionales en el ganado. Estos efectos pueden clasificarse en dos grupos (Reed *et al.*, 2000):

1.- Compuestos tóxicos: están presentes en plantas a bajas concentraciones (menos de 20 g Kg⁻¹ MS); tienen efectos psicológicos negativos y cuando son absorbidos provocan problemas neurológicos, y daños más severos como falla reproductiva, gangrena y muerte. Ejemplos de estas sustancias son alcaloides, saponinas, glucósidos cianogénicos y muchos otros.

2.- Compuestos no tóxicos: estos disminuyen la digestibilidad y palatabilidad de las plantas. El sitio primario de la actividad es el tracto digestivo o por órganos sensoriales asociados con el comportamiento alimentario. Incluye: taninos, lignina y terpenoides volátiles.

Los taninos son compuestos polifenólicos de estructura química diversa, son solubles en agua y con un peso molecular entre 500 y 3000. Las familias botánicas representativas con mayores contenidos de taninos son Fagaceae, Fabaceae, Mirtaceae y Rosaceae. Los órganos principales de las plantas donde se encuentran son: raíces-rizoma (rábano), corteza (roble y quina), leño (catecú), hojas (hamamelis) y frutos (cinorronones) (Isaza, 2007); también están presentes en arbustos y hojas de algunos árboles (Givens *et al.*, 2000). En la naturaleza se encuentran tres tipos de taninos desde el punto de vista químico: a) Proantocianidinas o taninos condensados, b) Taninos hidrolizables o pirogálicos y c) Florotaninos (Isaza, 2007).

Los taninos tienen la propiedad de formar complejos con las proteínas para formar complejos solubles e insolubles (Makkar, 2003b; Ramírez, 2003). La firmeza de estos complejos depende tanto de las características del tanino, como de la proteína (peso molecular, estructura terciaria, punto isoeléctrico y compatibilidad de los sitios de unión), (Reed, 1995).

Los taninos tienen diversos efectos como: disminución en la utilización de nutrientes particularmente en la utilización de la proteína, disminución en la palatabilidad y la ingesta de alimento, o disminución en la actividad de las enzimas digestivas (Makkar, 2003b), así mismo son antidiarréicos, antibacteriales, antivirales, astringentes, antitumorales, curtido, medicina tradicional, etc. (Isaza, 2007)

Se ha propuesto el uso de Polietilen glicol (PEG), con peso molecular de 4000 o 6000, para detectar la actividad biológica de los compuestos fenólicos en las plantas (Makkar *et al.*, 1995). El PEG es un agente que reduce o neutraliza el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal (Makkar *et al.*, 1995; McSweeney *et al.*, 2003); por lo que, un incremento en la producción de gas *in vitro* y en los parámetros de degradación cuando se suministra PEG indicaría la actividad de los taninos en los alimentos (Getachew *et al.*, 1998), además de mejorar el rendimiento animal (Barry *et al.*, 2001; Serge *et al.*, 2002), el aporte de energía metabolizable (Kamalak *et al.*, 2005), la ingesta y la digestibilidad (Kumar y Vaithyanathan, 1990). Se sugiere que el tratamiento con polietilen glicol 4000 parece viable para la reducción de los efectos de los taninos en el alimento (Óp. Cit.)

Makkar y Becker (1996) mencionan que el efecto del PEG depende del nivel de proteína en la dieta; es decir, cuanto más alto sea el nivel de proteína en un sustrato, menor será el efecto del PEG. Por otra parte, Rodríguez *et al.* (2006) reportan que no hay respuesta a la adición de PEG a ciertas especies, indicando que otros compuestos secundarios distintos a los taninos condensados pueden

afectar su utilización microbiana, o bien, distintos PEG (2000, 3000, 4000, 6000, 35,000) actúan bajo ciertas condiciones (Makkar, 2003a).

2.5. Importancia de taninos en rumiantes

La presencia de taninos en un gran número de hojas de árboles es nutricionalmente importante, debido a que impiden su utilización como alimento para los rumiantes (Ramírez, 2003).

Hay una baja degradabilidad de la materia seca de los materiales con mayor contenido de fibras y compuestos secundarios, mientras que, hay una alta degradabilidad ruminal y mayor calidad de la biomasa con menor concentración de fenoles y taninos. Los compuestos fenólicos tienen influencia negativa en la degradabilidad y digestibilidad de los recursos alimentarios. Los metabolitos secundarios (MSec.) también pueden ser benéficos debido al posible incremento de la proteína no degradada en el rumen, traducido esto en una absorción de nitrógeno en el intestino (García *et al.*, 2008).

En numerosos estudios se ha informado la acción negativa de los taninos en la degradación de los forrajes por inactivar algunas enzimas digestivas y disminuir, en algunos casos, la población de microorganismos en el rumen (Givens *et al.*, 2000; Makkar 2003b). Pueden también reducir el consumo de plantas debido a una disminución de la gustosidad o por afectar negativamente a la digestión. La astringencia es la sensación causada por la formación de complejos entre taninos y glicoproteínas salivales. La astringencia puede incrementar la salivación y disminuir la gustosidad (Reed, 1995). La presencia de taninos insolubles en la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) indica que los taninos están fuertemente ligados a la fibra (Van Soest, 1986). La fibra ligada a los taninos puede resistir la degradación a causa de los microorganismos ruminales, y también los taninos libres pueden inactivar los microorganismos y sus enzimas. Consecuentemente, la fermentación pudiera inhibirse en el rumen (Ramírez, 2003).

El efecto positivo de los taninos radica en la formación del complejo con las proteínas y su posterior ruptura en el abomaso (Makkar, 2003b). La diferencia entre los efectos tóxicos y benéficos depende de la dosis. También Givens *et al.* (2000) menciona que la actividad biológica de los taninos condensados depende de dos factores principales; la concentración y la estructura de los mismos (Hoste *et al.*, 2006)

Las altas concentraciones de taninos (5-10% de MS) deprimen el consumo y la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, de la fibra, de la proteína y de los carbohidratos, y por consiguiente afectan negativamente al desempeño productivo del animal, mientras que a menor concentración (2-4% de MS) podrían disminuir las pérdidas de la proteína de la ingesta producida por la proteólisis por los microorganismos del rumen e incrementar la absorción intestinal de las proteínas, además previenen infecciones (Waghorn *et al.*, 1997), reduce la solubilidad del nitrógeno de las proteínas contenidas en ensilados y mejora la eficiencia de la utilización de la proteína (Givens *et al.*, 2000).

Los llamados taninos condensados, han sido estudiados en leguminosas como: *O. viciaefolia*, *L. cornulatus* y *L. pedunculatus*, estos son asociados con una mejor digestión de la proteína y el metabolismo en los rumiantes además de que estos no se hinchan (Reed *et al.*, 2000; Waghorn *et al.*, 2008), pueden modificar la digestibilidad proteica de la dieta y los carbohidratos en forrajes usados por rumiantes (Mueller-Harvey y McAllan, 1992) y también protegen a los rumiantes contra la helmintiasis.

También se han estudiado los efectos de los extractos de algunas plantas (*A. millefolium*, *A. chamissonis*, *B. alba*, *D. glomerata*, *E. globulus*, *G. biloba*, *L. officinalis*, *L. capitata*, *H. perforatum*, *S. virgaurea*, *F. esculentum*, *E. arvense*, *S. officinalis*, *P. anisum*, *J. oxycedrus*, *C. annuum*, *C. cassia*, *S. aromaticum*, *A. graveolens*, *T. foenum*, *A. sativa*, *Z. officinale*, *O. vulgare*, *M. alternifolia*, y *A.*

rusticana) sobre la fermentación ruminal *in vitro* (Broudiscou *et al.*, 2000; Broudiscou *et al.*, 2002; Cardozo *et al.*, 2004; Cardozo *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2004; Busquet *et al.*, 2005; Busquet *et al.*, 2006).

2.6. Técnicas de producción de gas *in vitro*

En los estudios para estimar la digestibilidad en los forrajes hay dos técnicas de producción de gas *in vitro* más usadas. Estas técnicas tienen como principio fundamental que “la cantidad de gas producido durante la fermentación es proporcional a la cantidad de materia seca digerida” Menke *et al.*, 1979; Menke y Steingass, 1988; Blümmel y Ørskov, 1993

Menke (1979) y Menke y Steingass (1988) desarrollaron por primera vez la técnica de producción de gas *in vitro*, la cual consiste en incubar 200 mg de forraje en jeringas de vidrio graduadas (100 ml) con líquido ruminal y solución buffer en una proporción 1:2 (v/v). Se deben colocar jeringas blanco y muestras estándar e incubarse a 39°C. Con el promedio del gas de los blancos se corrige la producción de gas debida a la fermentación del alimento contenido en el líquido ruminal y con los estándares se controla la producción de gas.

Este método solo tiene una exactitud de lectura de ± 0.5 ml; sin embargo, es de fácil reproducción, bajo costo y además con esta técnica se puede obtener el aporte de EM de un alimento. Se toma en cuenta el volumen de gas producido hasta las 24 horas de fermentación, la cantidad de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, y las cenizas del alimento en evaluación. Se aplica la fórmula adecuada y se obtiene la energía metabolizable que aporta el alimento (Menke y Steingass, 1988).

Posteriormente Theodorou *et al.* (1991: 1994) desarrollan otro método, utilizando un transductor de presión; este mide la presión de gas generada por la fermentación del alimento en frascos de vidrio. Se colocan 0.999 g de forraje en los frascos con 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal. Se deben colocar frascos blanco y muestras estándar e incubarse a 39°C. Las lecturas son tomadas a intervalos regulares hasta obtener las 120 horas. El gas generado en cada lectura es liberado, el gas acumulado en cada lectura representa la cinética del proceso de fermentación del forraje (Theodorou *et al.*, 1991: 1994).

III. JUSTIFICACIÓN

En México la ganadería es una de las principales actividades, por ejemplo el sector lechero en el país representa la segunda actividad más importante dentro del subsector ganadero, con 22.8% del valor de la producción y es una de las principales fuentes de suministro de proteína animal dentro del país. Sin embargo, la alimentación del ganado juega un papel muy importante, pues muchas veces se alimenta a los bovinos con arvenses, que a su vez contienen cantidades importantes de metabolitos secundarios (taninos), los cuales pueden disminuir el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Por lo que es importante estudiar los efectos de estos compuestos secundarios en la fermentación ruminal y así encontrar alternativas positivas de alimentación para que no haya efectos negativos en la alimentación del ganado.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tendrá alguna especie tanífera efectos positivos sobre la fermentación ruminal?

V. HIPÓTESIS

Si hay efectos positivos en la fermentación ruminal con alguna de las especies taníferas entonces se logrará una mayor eficiencia de utilización de los nutrientes de manera que no se afecte la calidad del forraje ni la digestibilidad del alimento.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la producción de gas *in vitro* de seis especies taníferas utilizadas en dietas para bovinos lecheros.

Objetivos particulares

- Evaluar la composición química de cada especie tanífera.
- Evaluar el efecto de los taninos condensados sobre la producción de gas y la cinética de fermentación ruminal *in vitro* en cada especie tanífera.
- Evaluar la producción de gas en una dieta base adicionando cada una de las especies taníferas (extracto) a través de la técnica de producción de gas *in vitro*.
- Evaluar la cinética de la fermentación ruminal *in vitro* en una dieta base adicionada con especies taníferas (extracto) para evaluar su potencial forrajero.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en las instalaciones y laboratorios del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx.), y en la posta zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma Institución Académica. Se utilizaron dos bovinos fistulados para extraer el líquido ruminal.

7.1 Selección de las especies taníferas

Martínez-Loperena *et al.* (2011) realizaron un estudio en el Valle de Toluca, ellos evaluaron la cinética de fermentación ruminal de especies arvenses (con taninos) mezcladas con rastrojo de maíz, también determinaron la calidad nutritiva de cada arvense; de este trabajo *C. bipinnatus* y *T. lucida* fueron seleccionadas. Por otra parte, Figueroa-Medina *et al.* (2013) (datos aún no publicados), evaluaron la concentración de taninos condensados de 98 especies consumidas por el ganado en pastizales nativos del Sur del Estado de México. De este trabajo, se eligió a *C. sulphureus*, *T. erecta*, *M. diplotricha* y *M. divaricatum*. Todas las especies fueron elegidas por sus altos valores de taninos condensados y por ser ampliamente consumidas por el ganado.

C. bipinnatus y *T. lucida* fueron recolectadas en el Valle de Toluca; mientras que, *C. sulphureus*, *T. erecta*, *M. diplotricha* y *M. divaricatum* fueron recolectadas en Tejupilco, Estado de México. Esta actividad se realizó de Septiembre a Noviembre de 2010, en este periodo las especies se encontraban en proceso de floración y de cada especie se recolectaron ejemplares de tres muestreos distintos. Cada ejemplar se colocó en una secadora a aproximadamente 30°C durante 72 horas, posteriormente se molieron en un molino Willey a un tamaño de partícula de 1mm y se almacenaron individualmente en bolsas de plástico previamente etiquetadas. De la recolecta de los tres muestreos distintos de cada especie, se tomaron tres muestras representativas, y de cada muestra representativa se tomaron tres

submuestras representativas para los posteriores análisis y los dos experimentos realizados.

7.2 Determinación de metabolitos secundarios

Las especies taníferas se evaluaron para obtener el contenido de fenoles totales (FT), taninos no fenólicos (TNF) y taninos totales (TT), este último utilizando Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). Todos los análisis se realizaron por el método Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003b). El contenido de fenoles totales y taninos no fenólicos fue expresado como el equivalente de ácido tánico con la respectiva curva de calibración y la cantidad de taninos totales se obtuvo por diferencia entre los fenoles totales y taninos no fenólicos. Además, se evaluó el contenido de taninos condensados (TC) y taninos condensados ligados a la fibra (TCLF) por el ensayo de Butanol-HCl/Fe³⁺ (Makkar *et al.*, 2007). La cantidad de taninos condensados y taninos condensados ligados a la fibra fueron calculados por medio de un valor constante y el factor de dilución utilizado.

7.3 Análisis químico proximal

Las especies taníferas y la dieta base fueron evaluadas para determinar: a) su contenido de N por el método Kjeldhal (Digestor BÜCHI B435 y Destilador BÜCHI 323) multiplicado por 6.25 para expresarlo en proteína cruda (PC) (AOAC, 1990), b) fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest, 1991), c) extracto etéreo (NMX-F-615-NORMEX-2004), d) cenizas por incineración de la muestra en una mufla a 550°C durante 3 horas y e) energía metabolizable (EM, MJ/kg MS) a las 24 horas de fermentación de la muestra utilizando la técnica de producción de gas *in vitro* propuesta por Menke and Steingass (1988) para el primer experimento y la también sugerida por Theodorou (1994) para el segundo experimento.

7.4 Efecto del Polietilen glicol (PEG) sobre la fermentación ruminal con especies abundantes en taninos.

Se evaluó el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal para cada especie tanífera de manera individual. Se utilizó polietilen glicol (PEG-6000) como bloqueador de taninos y se evaluaron dos tratamientos (+PEG, -PEG). Se aplicó la técnica de producción de gas *in vitro* propuesta por Menke y Steingass (1988), modificada por Nagadi *et al.* (2000a y 2000b), utilizando una dilución 1:2 (líquido ruminal/solución buffer).

El líquido ruminal se colectó de dos bovinos fistulados (550 kg PV) en la mañana antes de ser alimentados, su dieta consistió en 60% de forraje (avena, 40% y alfalfa, 20%) y 40% de concentrado (maíz, 68%; melaza, 10%; urea, 2% y canola, 20%). Se utilizaron jeringas de 100 ml graduadas, en cada jeringa se pesó 0.500 g MS de cada especie tanífera, mas 1 g de PEG (+PEG) o 0 g de PEG (-PEG), y 50 ml de la solución buffer más líquido ruminal. Las jeringas se incubaron a 39°C en baño de agua. Se colocaron tres replicas por tratamiento para cada especie y las lecturas se efectuaron a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h de incubación.

7.5 Efecto en la fermentación ruminal de tres niveles de inclusión de extracto de taninos en una dieta base para ganado lechero.

Una vez comprobado el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal se inicio la obtención del extracto de los taninos por especie. El método de extracción fue por maceración; se pesaron 40 g de la planta y se colocó en un vaso de precipitado de 500 ml, se agregaron 100 ml de metanol-agua destilada (disolvente) en una proporción 70:30, se dejó en reposo durante tres semanas a temperatura ambiente y a la sombra (Isaza, 2007). Posteriormente se filtró el extracto con papel filtro (número 40) y se guardó en frascos ámbar a 4°C hasta su uso (Sabas, 2010).

Se evaluó el efecto de tres niveles de inclusión de extracto de taninos de cada especie tanífera de manera individual en una dieta base, esta consistió en 60% de forraje de pasto estrella y 40 % de concentrado (maíz, 68%; melaza, 10%; urea, 2% y canola, 20%). Los niveles de inclusión se determinaron por la cantidad de materia seca que se colocó a macerar en el disolvente, el volumen obtenido de extracto, la cantidad de taninos presentes en la especie y la cantidad de taninos que puede resistir un rumiante en su alimentación en materia seca (Otero e Hidalgo, 2004). Con base a este valor se utilizaron tres niveles de inclusión 1, 3 y 6% de inclusión de extracto correspondientes al nivel bajo, medio y alto. Se colocó una muestra sin extracto (control) para poder apreciar los efectos de cada extracto sobre la dieta base.

Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* propuesta por Theodorou *et al.*, (1994), para ello, se pesaron aproximadamente 0.999 g de la dieta base en botellas Wolf, se agregó el nivel de inclusión correspondiente para cada especie, 90 ml de solución buffer y 10 ml de líquido ruminal. Se incubaron a 39 °C en baño de agua y se colocaron tres replicas por tratamiento para cada extracto de cada especie tanífera. Las lecturas se realizaron con un transductor de presión (Delta OHM) a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h de incubación.

7.6 Cálculos.

Finalizado el periodo de incubación, en ambos experimentos se aplicó la microtécnica de Pell y Shofield (1993) a los residuos sobrantes para determinar la digestibilidad de la materia seca (dMS), materia orgánica (dMO) y la digestibilidad de la fibra detergente neutro (dFDN).

Para la dMS y dMO los residuos de una jeringa y/o botella Wolf por tratamiento por muestra (especie tanífera) se removieron con agua destilada y se colocaron en frascos. Para obtener la dFDN los residuos de dos jeringas y/o botellas por tratamiento por muestra (especie tanífera) se removieron con 25 y 50 ml de solución de fibra detergente neutro para el primer y segundo experimento

respectivamente y se colocaron en frascos. Todas las muestras sin distinción se llevaron a la autoclave por una hora a 105°C.

Posteriormente se filtraron en crisoles gooch (previamente colocados a peso constante y pesados) y se depositaron en una estufa a 105°C por 24-48 h, se enfriaron en un desecador y se registró su peso. Se distribuyeron en una mufla para incinerar a 450° C por 4 h. Se enfriaron en un desecador y se registró el peso final.

La energía metabolizable se calculó con ecuaciones diferentes de acuerdo a la técnica de producción de gas utilizada.

Experimento 1:

La energía metabolizable (EM: MJ/kg MS) se determinó con la siguiente ecuación (Steingass, 1983):

$$\text{EM: } 3.16 + 0.0695\text{GP} + 0.000730\text{GP}^2 + 0.00732\text{XP} + 0.02052\text{XL} \quad [1]$$

Dónde: GP: producción de gas a las 24 horas (ml gas/200 mg MS/ 24 h), XP: proteína cruda de la muestra (g/kg MS), XL: extracto etéreo de la muestra (g/kg MS).

Experimento 2:

La energía metabolizable ((EM) MJ/kg MS)) se determinó a partir de la siguiente fórmula (AFRC, 1993):

$$\text{EM (MJ/kgMS): } 0.0157 \cdot \text{dMO} \quad [2]$$

Dónde: dMO: digestibilidad de la materia orgánica (g/kg MS).

La cinética de la fermentación ruminal en ambos experimentos se estimó a partir del ajuste de la producción de gas propuesto por Jessop y Herrero (1996).

$$\text{GP} = a \times (1 - \exp(-ca + t)) + b \times (1 - \exp(-cb \times (t - lag))) \times (t > lag) \times -1. \quad [3]$$

Dónde: PG: es la producción acumulada de gas (ml gas/g MS), a : es la producción de gas a partir de la fermentación (ml gas/g MS) de la fracción soluble de los carbohidratos, b : es la producción potencial de gas (ml gas/g MS) a partir de la fracción insoluble pero potencialmente degradable, ca : es la tasa de fermentación (ml gas/g MS) de la fracción a , cb : la tasa de fermentación (ml gas/g MS) de la fracción b y lag: es el tiempo en horas (ml gas/g MS) antes de iniciar la fermentación de la FDN.

El ajuste de la producción de gas se realizó en el programa Grafit v3 (1992).

7.7 Diseño experimental

En el experimento 1 se evaluó el efecto del polietilén glicol (PEG) sobre la fermentación ruminal donde los tratamientos fueron + PEG y – PEG para cada especie tanífera (bloques) con tres repeticiones.

En el experimento 2 donde se evaluó el efecto en la fermentación ruminal de tres niveles de inclusión de extracto sobre la fermentación ruminal. Los tratamientos fueron nivel alto, medio y bajo de extracto de especie tanífera (bloques) con tres repeticiones. En ambos experimentos se utilizó el siguiente modelo general lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij};$$

Dónde: Y_{ij} = Respuesta en la unidad experimental con el tratamiento, μ = Media general, τ_i = Efecto del tratamiento ($i=1,2$), β_j = Efecto del bloque ($j=1, \dots, 6$) ε_{ij} = Error residual.

Finalmente, se realizó un análisis de regresión del efecto de los compuestos secundarios sobre los parámetros de la fermentación ruminal, las digestibilidades y la EM mediante el siguiente modelo:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \dots + \beta_p X_p + \xi_i$$

Dónde: Y_i : variable dependiente (dMS, dMO, dFDN, EM y parámetros de la cinética de fermentación ruminal), $X_1, X_2, X_3, X_4, \dots, X_p$: Variables independientes (FT, TNF, TT, TC, TCLF), $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \dots, \beta_p$: Parámetros de la ecuación de regresión lineal, ξ_i : Error aleatorio del i-esimo individuo.

7.8. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza y cuando se observaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey (Minitab V14, 2000).

VIII. RESULTADOS

8.1 Carta de recepción de artículo

De: ees.aniffee.0.23bd22.76b61652@eesmail.elsevier.com
[ees.aniffee.0.23bd22.76b61652@eesmail.elsevier.com] En nombre de
ANIFEE [aniffee@elsevier.com]

Enviado el: viernes, 06 de septiembre de 2013 08:02 p.m.
Para: Julieta Gertrudis Estrada Flores; efjulissa@hotmail.com
Asunto: A manuscript number has been assigned: ANIFEE-13-5157

Ms. No. ANIFEE-13-5157

Effect on ruminal fermentation of diets used for dairy cattle
with tannin-rich species added

Dear Dr. Estrada,

Your manuscript has been assigned the following reference
number: ANIFEE-13-5157

You will be able to check the progress of your paper by logging
in as Author at <http://ees.elsevier.com/aniffee/>

Please note that submission of an article is understood to imply
that the article is original and is not being considered for
publication elsewhere. Submission also implies that all authors
have approved the paper for release and are in agreement with
its content.

Thank you for submitting your manuscript to Animal Feed Science
and Technology.

Kind regards,

Editorial Office

Animal Feed Science and Technology

8.2 Artículo enviado

Effect on ruminal fermentation of diets used for dairy cattle with tannin-rich species added

B. Matías-González,^a O.A. Castelán-Ortega,^b M. González-Ronquillo,^b
J.G. Estrada-Flores^{a*}

^aInstituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR). ^bFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario No. 100, Col Centro, Toluca, state of Mexico, Mexico.

Artículo enviado al Animal Feed Science and Technology

Abstract

In recent years, research studies on ruminant nutrition have promoted the use of native, wild and cultivated forage plants as a feed supplement, due to their high protein content. However, these plants may contain secondary metabolites with a significant antimicrobial effect. They may modify ruminal fermentation and may increase the efficiency of forage use, and tannins are among these secondary compounds. The objective of this study was to evaluate the effect of tannins on ruminal fermentation kinetics in a base diet with tanniferous species (*C. sulphureus*, *C. bipinnatus*, *T. lucida*, *T. erecta*, *M. divaricatum* and *M. diplotricha*). Two experiments were conducted: the first to test the effect of tannins on ruminal fermentation, using polyethylene glycol (PEG) as a tannin blocker, and the second experiment consisted of evaluating a base diet with an extract from tanniferous species added (on an individual basis) with three levels of inclusion (high, medium and low). In both experiments, a random block design was used, and the variables evaluated were ruminal fermentation kinetics parameters; digestibility of dry matter (dDM), of organic matter (dOM) and of neutral detergent fiber (dNDF); and metabolizable energy (ME). With the addition of PEG to the tanniferous species, differences ($p < 0.05$) were observed at 24 and 96 hours of fermentation, between treatments (+PEG, -PEG) and among species, with an increase in gas production, and improvements in the dNDF and the contribution of ME (between treatments), and in the dDM, dOM, dNDF and ME (among species). In the case of ruminal fermentation kinetics parameters, no differences ($p > 0.05$) were noted. When an extract of tannins was added at the three levels of inclusion (high, medium and

low) to a base diet, no differences ($p>0.05$) were noted in fermentation kinetics parameters, in the dDM, dOM, dNDF or the ME. The only differences ($p>0.05$) observed among species were in fraction *b* and in the dNDF. However, improvements were noted in all the variables evaluated at the low level of inclusion. The addition of PEG to tanniferous species demonstrates the negative effect of tannins on ruminal fermentation. There was a favorable response in all the variables evaluated at the low level of inclusion.

Key words: extract, tannins, ruminal fermentation, polyethylene glycol.

Abbreviations: *C. sulphureus* (*Cosmos sulphureus*), *C. bipinnatus* (*Cosmos bipinnatus*), *T. lucida* (*Tagetes lucida*), *T. erecta* (*Tagetes erecta*), *M. divaricatum* (*Melampodium divaricatum*), *M. diplotricha* (*Mimosa diplotricha*), PEG (polyethylene glycol), dDM (digestibility of dry matter), dOM (digestibility of organic matter), dNDF (digestibility of neutral detergent fiber), ME (metabolizable energy).

* Corresponding author: Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico. Tel. and Fax: +52 722 296 55 52.

E-mail address: jgestradaf@uaemex.mx (J.G. Estrada-Flores).

1. Introduction

In recent years, research studies on ruminant nutrition have promoted the use of native, wild and cultivated forage plants as a feed supplement, due to their high protein content (Pinto-Ruiz *et al.*, 2009). However, these plants may contain secondary metabolites with a significant antimicrobial effect. They may modify ruminal fermentation and may increase the efficiency of forage use (Greathead, 2003), and tannins are among these secondary compounds (Makkar *et al.*, 2007).

Condensed tannins negatively affect ruminants at high concentrations, while they benefit them at low concentrations (Torres-Acosta *et al.*, 2008). A positive effect occurs when a tannin protects a plant protein (tannin-protein complex) from microbial degradation in the rumen. It can then be broken down in the abomasum, thus leading to the absorption of nitrogen in the intestine (Givens *et al.*, 2000). They have an antihelminthic (Salem *et al.*, 2012) and antitympanic (Torres-Acosta *et al.*, 2008) effect. The negative effects are manifested when there are high levels of condensed tannins, through a reduction in the digestibility of forages, the production of volatile fatty acids (Pinto-Ruiz *et al.*, 2009) and animal performance, depending on the amount and the biological activity of the tannins present (Schofield, 2001). It has been reported that tannins inactivate some digestive enzymes, and in some cases, diminish the population of microorganisms in the rumen, with the probability of inhibiting fermentation in the rumen (Givens *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2002). Recently, it has been suggested that the negative effect of tannins present in some forages may be diminished if such forages are

consumed in small amounts and mixed with other forages (Torres-Acosta *et al.*, 2008).

The effect of tannins on ruminal fermentation is not yet clear from these studies. Clausen *et al.* (1990) states that the condensed tannins of different plant species have physical and chemical properties that determine variations in terms of possible effects on ruminants. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* ruminal fermentation kinetics in six tanniferous species used in diets for dairy cattle.

2. Materials and methods

2.1. Selection of tanniferous species

Six tanniferous species were selected, some derived from the study conducted in the Valle de Toluca by Martínez-Loperena et al. (2011), who evaluated ruminal fermentation kinetics by combining different weeds (with tannins) eaten by livestock, one at a time, with corn stover. The species selected for that study were *C. bipinnatus* and *T. lucida*. In addition, Figueroa-Medina et al. (2013) (unpublished data) evaluated the concentration of condensed tannins in 98 species eaten by livestock in native grasslands in the southern part of the state of Mexico. The species selected for that study were *C. sulphureus*, *T. erecta*, *M. diplotricha* and *M. divaricatum*. All of these species were selected due to their high concentrations of condensed tannins and because they are widely eaten by livestock.

C. bipinnatus and *T. lucida* were collected in the Valle de Toluca, while *C. sulphureus*, *T. erecta*, *M. diplotricha* and *M. divaricatum* were collected in Tejupilco, in the state of Mexico, between September and November 2010. During those months these species were flowering, and specimens of each species were collected in three different samplings. Each specimen was placed in a dryer at 30° C/72 hours, then ground to 1 mm in a Willey mill, and stored individually in plastic bags. Of what was collected in the three samplings of each species, three representative samples were taken, and of each one of them, three sub-samples were taken for their subsequent analysis and use in experiments.

2.2. Determination of secondary metabolites and chemical composition

The tanniferous species were evaluated to determine the content of total phenols (TPs), non-phenolic tannins (NPTs) and total tannins (TTs), the latter by using Polyvinyl-Polypyrrolidone (PVPP). All the analyses were conducted using the Folin-Ciocalteu method (Makkar, 2003b). The TP and NPT content was expressed as a tannic acid equivalent with its respective calibration curve, and the TT amount was obtained by calculating the difference between TPs and NPTs. In addition the content of condensed tannins (CTs) and fiber-bound condensed tannins (FBCTs) was determined using the Butanol-HCl/Fe³⁺ test (Makkar et al., 2007). The amounts of CTs and FBCTs were calculated by way of a constant value and the dilution factor used.

Based on the tanniferous species and diet, the N content was determined, using the Kjeldhal method (BÜCHI B435 digestion unit and BÜCHI 323 distiller), multiplied by 6.25 to express the results in crude protein (CP) (AOAC, 1990), neutral detergent fiber (NDFom) and acid detergent fiber (ADFom) (Van Soest, 1991), etereo extract (NMX-F-615-NORMEX-2004), ash from incineration (550°C/3 hours) and metabolizable energy (ME, MJ/kg DM) at 24 hours of fermentation, using the *in vitro* gas production technique (Menke and Steingass, 1988).

2.3. Experiment 1

Effect of Polyethylene glycol (PEG) on ruminal fermentation

The effect of tannins on ruminal fermentation was evaluated individually for each tanniferous species. Polyethylene glycol (PEG-6000) was used as a tannin-blocker, and two treatments (+PEG, -PEG) were evaluated. The *in vitro* gas production technique proposed by Menke and Steingass (1988) and modified by

Nagadi *et al.* (2000a and 2000b) was applied, using a 1:2 dilution (ruminal liquid/buffer solution).

Ruminal liquid was collected from two fistulated cows at 08:00 hours before the morning feeding. Their diet consisted of 60% forage (40% oats and 20% alfalfa) and 40% concentrate (68% corn, 10% molasses, 2% urea and 20% canola). Graduated glass syringes (100 ml) were used, and 0.500 g DM of each tanniferous species was measured into each syringe, together with 1 g of PEG (+PEG) or 0 g of PEG (-PEG), and 50 ml of buffer solution/ruminal liquid. The syringes were incubated at 39°C in a bain-marie. Three samples for each treatment for each species were incubated, and readings were taken at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours of incubation.

2.4. Experiment 2

Effect on ruminal fermentation from a tannin extract, at three levels of inclusion, in a base diet for dairy cattle

After the effect of tannins on ruminal fermentation had been tested, the next step was to obtain the tannin extract for each species. The method of extraction was by maceration: 40 g of the plant was measured and placed in a beaker (500 ml), then 100 ml of distilled methanol-water (dissolvent) was added at a 70:30 ratio, and then it was left to rest for three weeks in a dark room at room temperature (Isaza, 2007). Subsequently, the extract was filtered using no. 40 filter paper, and it was stored in amber-colored jars at 4°C until it was used.

The effect from the three inclusion levels of the extract from tannins from each tanniferous species was evaluated individually in a base diet consisting of 60% star grass forage and 40% concentrate (68% corn, 10% molasses, 2% urea and 20% canola). The inclusion levels were determined by the amount of dry matter placed to be macerated in the dissolvent, the volume of extract obtained, the amount of tannins in the species, and the amount of tannins that a ruminant can tolerate in the dry matter it consumes (Otero and Hidalgo, 2004). Based on this value, the inclusion levels of the extract used were 1, 3 and 6%, corresponding to low, medium and high levels. A control sample was also used.

The *in vitro* gas production technique was used, in accordance with Theodorou *et al.* (1994). Approximately 0.999 g of the base diet was measured into wolf bottles, together with the inclusion level corresponding to each species, 90 ml of buffer solution and 10 ml of ruminal liquid. The bottles were incubated at 39°C in a bain-marie, with three samples per treatment for each extract for each tanniferous species. Readings were taken with a pressure transducer (Delta Hom) at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours of incubation.

2.5. Calculations

At the end of the incubation period, the technique proposed by Pell and Schofield (1993) was used to determine the digestibility of dry matter (dDM), of organic matter (dOM) and of neutral detergent fiber (dNDF). Metabolizable energy (ME) was determined in different ways in the two experiments.

2.5.1. Experiment 1:

Metabolizable energy ((ME) MJ/kg DM)) was determined through the following equation (Steingass, 1983):

$$\text{ME: } 3.16 + 0.0695\text{GP} + 0.000730\text{GP}^2 + 0.00732\text{XP} + 0.02052\text{XL} \quad [1]$$

Where: GP: gas production at 24 hours (ml gas/200 mg DM/ 24 h), XP: crude protein from the sample (g/kg DM), XL: etereo extract from the sample (g/kg DM).

2.5.2. Experiment 2:

Metabolizable energy ((ME) MJ/kg DM)) was determined using the following formula (AFRC, 1993):

$$\text{ME (MJ/kgDM): } 0.0157 \cdot \text{dOM} \quad [2]$$

Where: dOM: digestibility of organic matter (g/kg DM).

Ruminal fermentation kinetics was estimated in both experiments on the basis of the adjustment in gas production proposed by Jessop and Herrero (1996).

$$\text{GP} = a \times (1 - \exp(-ca + t)) + b \times (1 - \exp(-cb \times (t - \text{lag}))) \times (t > \text{lag}) \times -1 \quad [3]$$

Where: GP: is accumulated gas production (ml gas/g DM); *a*: is gas production based on fermentation (ml gas/g DM) of the soluble fraction of the carbohydrates; *b*: is potential gas production (ml gas/g DM) based on the insoluble but potentially degradable fraction; *ca*: is the fermentation rate (ml gas/g DM) of fraction *a*; *cb*: is the fermentation rate (ml gas/g DM) of fraction *b*; and lag: is the time in hours (ml gas/g DM) prior to initiating the fermentation of the NDF. The adjustment in gas production was carried out in the Grafit v3 program (1992).

2.6. Experiment design

The effect of polyethylene glycol (PEG) on ruminal fermentation was evaluated in experiment 1, with the + PEG and – PEG treatments for each tanniferous species (blocks), with three repetitions. And what was evaluated in experiment 2 was the effect on ruminal fermentation by the three inclusion levels of extract, specifically high, medium and low levels of extract from tanniferous species (blocks), with three repetitions. In both experiments the following general linear statistical model was used:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij};$$

Where: Y_{ij} : Response in the experimental unit with the treatment; μ : General mean; τ_i : Effect of treatment ($i=1,2$); β_j : Effect of block ($j=1, \dots, 6$); and ε_{ij} : Residual error.

When significant differences ($P < 0.05$) were observed, a test was applied for comparing Tukey means (Minitab V14, 2000).

Lastly, a regression analysis was conducted of the effect from secondary compounds on the ruminal fermentation parameters, digestibilities and ME, by using the following model:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \dots + \beta_p X_p + \xi_i$$

Where: Y_i : dependent variable (dDM, dOM, dNDF, ME and ruminal fermentation kinetics parameters), $X_1, X_2, X_3, X_4, \dots$; X_p : independent variables (TP, NPT, TT, CT, FBCT), $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \dots$; β_p : Parameters of the linear regression equation; ξ_i : Random error of the i th observation.

3. Results

3.1 Secondary metabolites and chemical composition

C. sulphureus was the species with the highest concentration of total phenols, total tannins, condensed tannins and fiber-bound tannins, while *T. erecta* and *T. lucida* presented significant levels of concentration for only total phenols and condensed tannins. In addition, *C. bipinnatus*, *M. diplotricha* and *M. divaricatum* were the species with limited concentrations of total phenols and total tannins (Table 1).

C. sulphureus, *C. bipinnatus* and *T. erecta* presented the best nutritional characteristics, contributing a significant amount of protein, in addition to limited amounts of soluble carbohydrates. *M. diplotricha* is also a significant source of protein, and the amount of fiber from this species was greater, at 510 g. The species that presented low nutritional quality was *T. lucida*, since it is deficient in protein. The values for protein and fiber in the base diet and *M. divaricatum* were adequate for forages. The ether extract in the base diet and the species ranges from 10 to 30 g, and the amount of ashes was between 60 and 110 g.

3.2. Experiment 1

Effect of polyethylene glycol on ruminal fermentation

A positive effect was observed at 24 hours of fermentation in *C. sulphureus*, *T. lucida* and *M. divaricatum* (Tables 3 and 4). The other species did not respond favorably to the inclusion of PEG (Table 3). Therefore, significant differences ($P < 0.05$) were observed at 24 and 96 hours of fermentation between treatments (-PEG, +PEG) and among species (Table 4). In these two variables, only *C. bipinnatus* and *T. erecta* generated a volume of GP greater than 100 and 125 ml,

at 24 and 96 hours of fermentation, respectively, with regard to the other species (Table 4). *T. lucida* was the only species that recuperated GP from 24 to 96 hours of fermentation, with respect to the remaining species, since 40 ml was generated and this is reflected in the dDM and dOM (Table 4).

In fermentation parameters, there was an increase in fraction *a* in *C. bipinnatus*, *T. lucida* and *M. diplotricha* (Table 3). *T. lucida* presented a fermentation rate (*ca*) in this fraction of 0.5, and in the other species the fermentation rates observed were below 0.5 (Table 4). In fraction *b*, *T. lucida*, *T. erecta* and *C. sulphureus* presented greater availability of structural carbohydrates, and the last two species had a *cb* of 0.07, while the rest of the species had a *cb* below this value (Table 4). In most of the species, the *lag* time fluctuated; it diminished in *C. sulphureus* and *M. divaricatum*, and it increased in *C. bipinnatus*, *M. diplotricha* and *T. lucida* (Table 3). No differences ($P>0.05$) were observed in any of the fermentation parameters between treatments or among species (Table 4).

The dDM and dOM improved in the *C. bipinnatus*, *T. lucida* and *T. erecta* species, while no improvement was observed in the other species. The dNDF improved in all the species, especially in *C. sulphureus*, *C. bipinnatus*, *T. lucida* and *M. divaricatum* (Table 3). Consequently, there were significant differences ($P<0.05$) among species, but not between treatments (Table 4). There was an increase in the ME contributed in all the species, and *T. lucida* was the species that contributed the most ME (Table 3). Therefore, the ME contribution was significant ($P<0.05$) both between treatments and among species (Table 4).

3.3. Experiment 2

Effect on ruminal fermentation from three levels of inclusion of tannin extract in a base diet for dairy cattle

When three inclusion levels of tannin extract were added, a positive effect was observed through the increase in the availability of fraction *a* at a high level (*T. lucida*, *M. divaricatum*), a medium level (*T. erecta*) and a low level (*M. diplotricha*). At the three inclusion levels, the fermentation rate of this fraction (*ca*) increased in most of the species, with the exception of *T. lucida*, in which case the *ca* diminished (Table 5). Even so, no differences ($P>0.05$) were observed in these two parameters among the three inclusion levels or among species (Table 6). No increases in GP were observed in the three levels of inclusion in fraction *b*. However, in *C. sulphureus*, *T. lucida*, *M. divaricatum* (Tables 5 and 6) and *T. erecta* (Table 5), greater availability was observed in this fraction. GP in this fraction (*b*) in *M. diplotricha* was different ($P<0.05$) with respect to the other species, since GP diminished (Table 6) and so did dNDF (Tables 5 and 6). In most of the species, the lag time diminished with respect to the base diet (Table 5). Differences ($P>0.005$) were not observed among the inclusion levels or among species (Table 6). At a low level of inclusion for *C. sulphureus*, *C. bipinnatus* and *T. lucida*, the dDM, dOM, dNDF and ME improved, and this was also true for the high level when *T. erecta* was included (Table 5). Even so, these digestibilities and the ME were not different ($P>0.05$) at the three inclusion levels, or among species ($P>0.05$) (Table 6). At the low level of inclusion, all the variables evaluated

improved with respect to the base diet, however no improvement was noted when medium and high levels of the extract were included (Table 6).

The effect of secondary metabolites on fermentation kinetics parameters and digestibilities can be observed in Table 7. There was a positive effect on fraction *a* and on the dDM when TPs, NPTs, TTs, CTs and FBCTs were found in the extracts evaluated, and only in the fermentation rate of fraction *a* (*ca*) when FBCTs were present.

4. Discussion

Variations in the CT concentration for each species, according to Lanyasunya *et al.* (2008), are due to the plant's degree of maturity, as well as environmental factors in a species' location (López *et al.*, 2006). In addition, Clausen *et al.* (1990) mentions that the CTs of different species have different physical and chemical properties that determine variations in terms of possible effects on ruminants.

In the experiment in which PEG was used, the inhibitory effect of CTs on ruminal fermentation was observed. Various studies reach the same conclusion that when this blocker is added to species with high tannin concentrations, GP increases, and dOM and ME improve significantly (Getachew *et al.*, 2001; Kamalak *et al.*, 2005; Makkar *et al.*, 1995). There are species that have a limited amount of tannins, and also have a significant effect on ruminal fermentation. In this case *T. lucida* was the species that best responded to the inclusion of PEG, with improvement in dDM, dOM, dNDF, ME contribution and also the availability of fractions *a* and *b*, and their respective fermentation rates (*cb* and *ca*). This is due to the type of plant, its chemical composition (Benchaar *et al.*, 2008) and the pH of the ruminal liquid (Patra and Saxena, 2009). Although it is a species of low nutritional quality, its low CT content works in its favor (Givens *et al.*, 2000). The increase in the availability of ME in all the species, particularly in *C. bipinnatus* and *T. erecta*, coincides with the results reported by Kamalak *et al.* (2005), who state that using a tannin blocker will make the nutrients in the diet more available for microorganisms. The addition of PEG demonstrated an increase in all fermentation kinetics parameters. According to Makkar (2003a), the addition of PEG diminishes microbial inhibition

and reduces antinutritive effects (Khazaal *et al.*, 1996), mitigating the adverse effects of secondary compounds on ruminal fermentation, and increasing the availability and degradability of nutrients. Makkar (2003a) also comments that the different PEGs (2000, 3000, 4000, 6000 and 35,000) act under certain conditions, and that CTs have inhibitory effects on cellulose digestion. This is not only due to the inactivation of extracellular enzymes, but also may be due to interference in the adhesion of bacteria on cellulose (Ferme *et al.*, 2004). It has been demonstrated in some studies that adding tannins to forage does not modify ruminal fermentation, dDM, dOM or NDF. These variations may be caused by different types of tannins (hydrolyzable, condensed) and by their origin (Cieslak *et al.*, 2012).

In the second experiment the availability of fraction *b* was improved at the three levels of inclusion. This was due to the amount of FBCTs in these species. When the FBCTs are low, there is no inhibition in the availability of this fraction in the rumen. However, Ramirez *et al.* (2002) states that fiber-bound tannins can resist their degradation by ruminal microorganisms, and furthermore free tannins may inactivate some microorganisms and their enzymes, thereby inhibiting fermentation in the rumen. At the low inclusion level, improvement was observed in the values in *a*, *b* and *cb*. This was due to the minimum amount of CTs at this inclusion level, since if ruminants eat plants with high CT levels, the utilization of nutrients diminishes (Hoste *et al.*, 2006), the population and activity of ruminal microorganisms decreases (Priolo *et al.*, 2000), the number of protozoa diminishes (Animut *et al.*, 2008; Cieslak *et al.*, 2012) and cellulolytic and proteolytic bacteria increase (McSweeney *et al.*, 2001). Makkar (2003a) agrees, stating that tannins

inactivate some digestive enzymes, and in some cases, diminish the microorganism population in the rumen. All of this occurs when there are excessive amounts of CTs, thus confirming a positive or negative effect of tannins on fermentation kinetics parameters. Patra and Saxena (2011), for their part, state that the effects of tannins are variable. In the current experiment, the three inclusion levels were different for each species, and consequently, the effects of certain secondary compounds are determined by the amounts of condensed tannins added to the diet and the type of forage in the diet (Salem *et al.*, 2012). No benefits were observed at any inclusion level in the dDM, dOM, dNDF and ME, with respect to the base diet. Dawson *et al.* (1999) comment that tannins may cause a decrease in plant digestibility as well as inadequate functioning of the rumen. In addition high levels of condensed tannins reduce plant digestibility (Ramírez *et al.*, 2002), and in this case of the base diet, when the extract is added. According to Patra and Saxena (2011), the effects of tannins on bacteria, fungi, rumen protozoa and methanogens are variable and depend particularly on the type of tannin, its origin and supplementation level. In addition, Patra and Saxena (2009) state that methanol is produced naturally in the rumen and in minimal amounts, and it does not have antimicrobial properties. Tannins act as antimicrobial agents (Cieslak *et al.*, 2012; García *et al.*, 2008; Makkar, 2003a; Pinto-Ruiz *et al.*, 2009; Salem *et al.*, 2012). It is important to mention that low values in ruminal digestibility, according to Jackson *et al.* (1996), may be associated with the plant's age and the presence of lignified material. In general the discrepancies in the values reported for the three inclusion levels in all the

variables evaluated in this experiment may be a result of the type of tannin and its origin, according to Cieslak *et al.* (2012).

5. Conclusion

The addition of PEG to tanniferous species demonstrated the negative effect of condensed tannins on ruminal fermentation. High and medium levels of inclusion negatively affected fermentation kinetics parameters and dNDF, dDM and dOM. The low level of inclusion moderately benefited these variables evaluated, and therefore tannins in low concentrations suggest beneficial effects for ruminants.

6. Acknowledgements

The authors wish to express their appreciation to the Universidad Autónoma del Estado de México, through the Technology Transfer Project for standardizing and improving the productive processes for *ranchero* and Zacazonapan cheese. Financing: UAEM:1873/2009C CONACYT:CON-2008. They also thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted during the 2010-2012 period, and the Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) for the scholarship granted for the completion of this study, under code 11BTM0256. And they express their appreciation to the Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) at the Universidad Autónoma del Estado de México for the support and materials provided to make this project possible.

7. References

- Agricultural and Food Research Council (AFRC), 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, UK.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 212–227.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145, 209–228.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Szumacher-Strabel, M., 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim. Feed Sci. Tech.* 176, 102-106.
- Clausen, T.P., Provenza, F.D., Burritt, E.A., Reichardt, P.B., Bryant, J.P., 1990. Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *J. Chem. Ecol.* 16, 2381-2392.
- Dawson, J.M., Buttery, P.J., Jenkins, D., Wood, C.D., Gill, M., 1999. Effects of dietary Quebracho tannin on nutrient utilization and tissue metabolism in sheep and rats. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1423-1430.
- Ferre, D., Banjac, M., Calsamiglia, S., Busquet, M., Kamel, C., Avgustin, G., 2004. The effects of plant extracts on microbial community structure in a

- rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia Microbiol. (Praha)* 49, 151–155.
- García, M.D., Wencomo, G.H., González, C.M., Medina, R.M., Cova, O.L., 2008. Caracterización de diez cultivares forrajeros de *Leucaena leucocephala* basada en la composición química y la degradabilidad ruminal. *Rev. MVZ Córdoba*. 13 (2), 1294-1303.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. *Anim. Feed Sci. Tech.* 92, 51-57.
- Givens, D.I., Owen, E., Oxford, R.F.E., Omed, H.M., 2000. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, New York, E.U.
- Grafit, 1992. Data Analysis and Graphics Program Ver 3. Erithacus Software Ltd.
- Greathead, H., 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62:279-290.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253-261.
- Isaza, M.J.H., 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et. Technica.* 33 (13), 13-18.
- Jackson, F.S., Barry, T.N., Lascano, C., Palmer, B., 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forages legumes. *J. Sci. Food Agric.* 17 (1), 103-110.

- Jessop, N.S., Herrero, M., 1996. Influence of soluble components on parameter estimation using the *in vitro* gas production technique. *Anim. Sci.* 62, 626-627.
- Jiménez-Peralta, F.S., Salem, A.Z.M., Mejía-Hernández, P., González-Ronquillo, M., Albarrán-Portillo, B., Rojo-Rubio, R., Tinoco-Jaramillo, J.L., 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livest. Sci.* 136, 192–200.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Sahin, M., Gurbuz, Y., Ozkose, E., Ozkan, C.O., 2005. The effect of polyethylene glycol (PEG 8000) supplementation on *in vitro* gas production kinetics of leaves from tannin containing trees. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 35 (4), 229-237.
- Khazaal, K.A., Parissi, Z., Tsiouvaras, C., Nastis, A., Ørskov, E.R., 1996. Assessment of phenolics-related antinutritive levels using the *in vitro* gas production technique: a comparison between different types of polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol. *J. Sci. Food Agric.* 71, 405–414.
- Lanyasunya, T.P., Hongrong, W., Kariuki, S.T., Mukisira, E.A., Abdulrazak, S.A., Kibitok, N.K., Ondiek, J.O., 2008. The potencial of *Commelina benghalensis* as a forage for ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 185-195.
- López, S., García-González, R., Fernández, M., Bodas, R., González, J.S., 2006. Medicinal plants as feed additives in animal nutrition. In: Singh, K.K., Govil, J.N., Ahmad, K., Sharma, R.Kr. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants*,

Vol: 15. Natural Products. Studium Press LLC, Houston, TX, USA, pp. 309–333.

Makkar, H.P.S., 2003a. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant. Res.* 49, 241–256.

Makkar, H.P.S., 2003b. Chemical, protein precipitation and bioassays for tannins, tannin levels and activity in unconventional feeds, and effects and fate of tannins. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 1-42.

Makkar, H.P.S., Blummel, M., Becker, K., 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *Br.J. Nutr.* 73, 897-913.

Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P., Becker, C., 2007. *Plant Secondary Metabolites*. Human Press. Stuttgart, Germany.

Martínez-Loperena, R., Castelán-Ortega, O. A., González-Ronquillo, M., Estrada-Flores, J. G., 2011. Nutritive value, *in vitro* fermentation and secondary metabolites of weeds and maize straw used for feeding dairy cattle. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14, 525-536.

McSweeney, C., Palmer, B., Bunch, R., Krause, D., 2001. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90, 78–88.

- Menke, H.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, 7-55.
- Minitab, 2000. Statistical software. User's guide 1: Data graphics, and macros Ver 14. USA.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000a. The effect of fermentable nitrogen availability on *in vitro* gas production and degradability of NDF. Anim. Feed Sci. Tech. 87, 241-251.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000b. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. Anim. Feed Sci. Tech. 87, 231-239.
- NMX-F-615-NORMEX-2004. Alimentos. Determinación de extracto etéreo en alimentos. Método de prueba, (Método SOXHLET).
- Otero, M.J., Hidalgo, L.G., 2004. Condensed tannins in temperate forage species: effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites (a review). Livest. Res. Rural Dev. 16(2), 1-17.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. Anton. Van Leeuw. 96, 363-375.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. J. Sci. Food Agric. 91, 24-37.
- Pell, A.N., Schofield, P., 1993. Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. J. Dairy Sci. 76, 1063-1073.

- Pinto-Ruiz, R., Hernández-Sánchez, D., Ramírez-Avilés, L., Sandoval-Castro, C. A., Cobos-Peralta, M., Gómez-Castro, H., 2009. Taninos y fenoles en la fermentación *in vitro* de leñosas forrajeras tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 20 (1), 81-89.
- Priolo, A., Waghorn, G.C., Lanza, M., Biondi, L., Pennisi, P., 2000. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* 78, 810-816.
- Ramírez, O.R., Ramírez, L.R.G., López, G.F., 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL*. 5 (2), 180-189.
- Salem, A.Z.M., López, S., Robinson, P.H., 2012. Plant bioactive compounds in ruminant agriculture—Impacts and opportunities. *Anim. Feed Sci. Tech.* 176, 1-4 (special issue).
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 21-40.
- Steingass, H., 1983. Bestimmung des energetischen futterwertes von wirtschaftseigenen futtermitteln aus der gasbildung bei der panserfermentation *in vitro*. Hohenheim, Univ., Fak. IV, Diss.
- 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. Tech.* 48, 185-197.

- Torres-Acosta, J.F.J., Alonso-Díaz, M.A., Hoste, H., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., 2008. Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 9 (1), 83-90.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., 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.

TABLES

Table 1. Concentration of secondary metabolites, by tanniferous species.

	TPs	NPTs	TTs	CTs	FBCTs
	g/ kg DM				
<i>C. sulphureus</i>	142.2	4.4	137.9	111.4	10.9
<i>C. bipinnatus</i>	36.7	1.3	35.5	12.6	3.6
<i>T. lucida</i>	68.1	2.3	65.8	0.6	1.1
<i>T. erecta</i>	89.4	2.2	87.2	2.5	1.8
<i>M. diplotricha</i>	19.7	1.9	17.8	5.2	7.8
<i>M. divaricatum</i>	39	2.1	36.9	1.2	0.6

TPs: total phenols, NPTs: non-phenolic tannins, TTs: total tannins, CTs: condensed tannins, FBCTs: fiber-bound condensed tannins.

Table 2. Chemical composition of the six tanniferous species and the base diet.

	CP	NDFom	ADFom	EE	Ashes
	g/kg MS				
Base diet	106.13	444.69	195.24	13.28	68.80
<i>C. sulphureus</i>	137.51	335.39	266.74	12.09	88.80
<i>C. bipinnatus</i>	137.36	455.26	317.25	24.38	87.80
<i>T. lucida</i>	85.06	426.59	296.40	15.17	72.65
<i>T. erecta</i>	117.76	244.63	174.32	10.52	100.81
<i>M. diplotricha</i>	167.68	513.37	346.80	20.83	63.77
<i>M. divaricatum</i>	111.83	397.25	293.28	32.81	107.08

CP: crude protein; NDFom: neutral detergent fiber; ADFom: acid detergent fiber; EE: etereo extract; Ashes.

Table 3: Effect of PEG on *in vitro* ruminal fermentation kinetics, by tanniferous species.

Tanniferous species	PEG	Fermentation parameters (ml gas/g DM)					<i>In vitro</i> gas production (ml/g DM)		<i>In vitro</i> digestibilities of substrates (g/kg DM) and ME (MJ /kg DM)			
		<i>a</i>	<i>ca</i>	<i>b</i>	<i>cb</i>	<i>Lag</i>	GP 24	GP 96	dDM	dOM	dNDF	ME
							h	h				
<i>C. sulphureus</i>	-	38.7	0.07	68	0.06	6.8	78	107.6	372.8	303.5	350.8	7.3
	+	31.8	0.17	94	0.08	3.4	105	129	443.9	372	621.7	8.6
<i>C. bipinnatus</i>	-	54.5	0.18	84.6	0.05	2.4	109	140.6	455.6	382	389	9.1
	+	79	0.15	65	0.03	3.4	110.7	142.9	470.8	397	468	9.2
<i>T. lucida</i>	-	9.2	0.94	118	0.02	2.1	63.7	117.7	567.9	499.5	256.8	6.4
	+	70	0.08	54	0.05	3.4	96.7	123.9	614	568.5	319.8	7.9
<i>T. erecta</i>	-	46	0.17	94	0.07	2.6	117	144.7	725.8	602	562.7	9.1
	+	49	0.17	94.5	0.07	2.6	120.5	148	751	635.5	597.9	9.3
<i>M. diplotricha</i>	-	23	0.38	85	0.05	2.3	84.4	109	522	492	349.8	8
	+	68	0.13	49	0.03	3.3	90.7	116	527	487	356	8.3
<i>M. divaricatum</i>	-	61.6	0.21	23	0.01	2.9	65.5	77.4	495.7	414.6	247.9	7
	+	45	0.28	45	0.08	1	82.2	92.9	490.8	420	355	7.7

a: Fermentation rate at 4 hours of fermentation; *ca*: Fermentation rate in fraction a; *b*: potential gas production; *cb*: Fermentation rate in fraction b; *lag*: Phase prior to initiating the fermentation of NDF; GP: gas production; dDM: digestibility of dry matter; dOM: digestibility of organic matter, dNDF: digestibility of neutral detergent fiber; ME: metabolizable energy.

Table 4: Effect of PEG, by treatment and species, on *in vitro* ruminal fermentation kinetics.

Tanniferous species	Fermentation parameters (mlgas/g DM)					<i>In vitro</i> gas production (ml/g DM)		<i>In vitro</i> digestibilities of substrates (g/kg DM) and ME (MJ /kg DM)			
						GP 24	GP 96	dDM	dOM	dNDF	ME
	<i>a</i>	<i>ca</i>	<i>b</i>	<i>cb</i>	<i>Lag</i>	h	h				
Treatment											
PEG (-)	39	0.3	78.9	0.04	3.2	86.34 ^a	116 ^a	535	460	359.5	7.8 ^a
PEG (+)	57	0.16	67	0.056	2.8	100.92 ^b	125.5 ^b	537.8	468.7	453	8.5 ^b
P	0.199	0.326	0.447	0.387	0.675	0.042	0.030	0.879	0.675	0.058	0.040
SEM	12.4	0.14	14.3	0.01	0.77	5.3	3.1	16.4	18.7	38	0.25
Tanniferous species											
<i>C. sulphureus</i>	35.3	0.12	81.2	0.07	5.1	91.3 ^{ab}	118.4 ^a	408.3 ^a	337.9 ^a	486.2 ^{edf}	7.9 ^{ac}
<i>C. bipinnatus</i>	66.8	0.16	75	0.04	2.9	109.4 ^{ad}	141.7 ^{bc}	463.2 ^{ad}	389.7 ^{af}	428.6 ^{edf}	9.1 ^a
<i>T. lucida</i>	39.8	0.51	86.1	0.03	2.7	80.2 ^a	120.8 ^{ab}	591 ^b	534 ^{bcde}	288.3 ^d	7.1 ^{cd}
<i>T. erecta</i>	47.7	0.17	94.4	0.07	2.6	119 ^{bcd}	146.4 ^c	738.4 ^c	618.7 ^{cd}	580.3 ^{fe}	9.2 ^a
<i>M. diplotricha</i>	45.7	0.25	67.1	0.04	2.8	87.6 ^{ac}	112.7 ^a	524.8 ^{db}	489.5 ^{df}	352.9 ^{df}	8.1 ^{ade}
<i>M. divaricatum</i>	53.4	0.24	34.1	0.04	2	73.8 ^a	85.1 ^d	493.3 ^{ab}	417.5 ^{aef}	302 ^d	7.3 ^{ce}
P	0.748	0.710	0.340	0.572	0.401	0.026	0.001	0.001	0.002	0.037	0.019
SEM	8.8	0.1	10.1	0.009	0.6	3.7	2.2	11.6	13	27	0.2

a: Fermentation rate at 4 hours of fermentation; ca: Fermentation rate in fraction a; b: potential gas production; cb: Fermentation rate in fraction b; lag: Phase prior to initiating fermentation of the NDF; GP: gas production; dDM: digestibility of dry matter; dOM: digestibility of organic matter; dNDF: digestibility of neutral detergent fiber; ME: metabolizable energy; abcdef: differences in the letters in the columns indicate significant differences (P <0.05). SEM: Standard error of the mean.

Table 5: Effect from three inclusion levels of tannin extract (ml /g DMS) added to a base diet, on the parameters of *in vitro* ruminal fermentation kinetics.

Species	Inclusion level	Fermentation parameters (ml gas/g DM)					Digestibility of substrates (g/kg DM) and ME (MJ /kg DM)			
		<i>a</i>	<i>ca</i>	<i>b</i>	<i>cb</i>	<i>Lag</i>	dDM	dOM	dNDF	ME
Base diet		28.5	0.2	381.7	0.04	7.8	735.7	682.5	661.8	10.7
<i>C. sulphureus</i>	High	19.2	0.08	440.8	0.01	5.5	676.7	631.6	436.1	9.9
	Medium	17	0.16	544.3	0.01	8.3	697.2	655.5	486	10.3
	Low	9.1	0.5	548.5	0.02	7.7	741.3	692.9	556.7	10.9
<i>C. bipinnatus</i>	High	3.2	0.4	285.4	0.04	4.7	432.4	406.9	39.8	6.4
	Medium	26	0.1	274.8	0.04	5.7	626.9	594.4	443.9	9.3
	Low	16.4	0.2	585.1	0.02	6.6	692.3	684.9	622.1	10.8
<i>T. lucida</i>	High	43.7	0.1	526.2	0.02	6.4	716.3	670.3	608.9	10.5
	Medium	0.5	0	574.1	0.02	5.7	731.6	686.6	628.1	10.8
	Low	0.3	0	751.9	0.02	5.4	742.1	691.5	664.9	10.9
<i>T. erecta</i>	High	15.6	0.3	567.6	0.02	6.8	737.3	689.8	378.3	10.8
	Medium	96.5	0.04	515.5	0.02	7.8	705	655.9	345.8	10.3
	Low	42	0.1	409.2	0.05	9.8	713.2	660.7	367.9	10.4
<i>M. diplotricha</i>	High	4.3	0.1	85	0.01	10	411.9	394.7	6.3	6.2
	Medium	26.7	0.05	150	0.03	5.9	697.1	647.4	38.9	10.2
	Low	220.8	0.02	136.7	0.11	10.1	657.1	598.6	65.1	9.4
<i>M. divaricatum</i>	High	43.2	0.1	477.6	0.02	5	695.2	653.3	541.5	10.3
	Medium	24.2	0.3	590.6	0.02	5.8	701.3	652.7	588.8	10.3
	Low	3.5	0	631.5	0.02	5.33	711.7	667.2	585.8	10.5

a: Fermentation rate at 4 hours of fermentation; ca: Fermentation rate in fraction a; b: potential gas production; cb: Fermentation rate in fraction b; lag: Phase prior to initiating fermentation of the NDF; dDM: digestibility of dry matter; dOM: digestibility of organic matter; dNDF: digestibility of neutral detergent fiber; ME: metabolizable energy.

Table 6: Effect on the parameters of *in vitro* ruminal fermentation kinetics from three inclusion levels of tannin extract (ml /g DM) added to a base diet.

Inclusion level	Fermentation parameters (ml gas/g DM)					<i>In vitro</i> digestibility of substrates (g/kg DM) and ME (MJ /kg DM)			
	<i>a</i>	<i>ca</i>	<i>b</i>	<i>cb</i>	<i>lag</i>	dDM	dOM	dNDF	ME
High	21.6	0.2	397	0.02	6.4	611.6	574	335	9.01
Medium	31.8	0.1	441.6	0.02	6.5	693	648.8	422	10.2
Low	48.7	0.1	511	0.04	7.5	709.6	666	477	10.5
P	0.711	0.663	0.155	0.306	0.373	0.093	0.108	0.143	0.108
SEM	32.6	0.08	53.8	0.01	0.8	42.6	41.1	65.6	0.6
Tanniferous species									
<i>C. sulphureus</i>	15.1	0.23	511.2 ^a	0.01	7.2	705	660	493 ^a	10.4
<i>C. bipinnatus</i>	15.2	0.24	381.8 ^a	0.03	5.7	583.8	562	368.6 ^a	8.8
<i>T. lucida</i>	14.8	0.03	617.4 ^a	0.02	5.8	730	682.8	634 ^a	10.7
<i>T. erecta</i>	51.4	0.15	497.4 ^a	0.03	8.1	718.5	668.8	364 ^a	10.5
<i>M. diplotricha</i>	83.9	0.06	124.1 ^b	0.05	8.7	588.7	546.9	36.8 ^b	8.6
<i>M. divaricatum</i>	23.6	0.15	566.5 ^a	0.02	5.4	702.7	657.8	572.1 ^a	10.3
P	0.605	0.493	0.001	0.465	0.061	0.106	0.153	0.001	0.153
SEM	23.1	0.06	38	0.009	0.56	30.11	29.1	46.4	0.5

a: Fermentation rate at 4 hours of fermentation; ca: Fermentation rate in fraction a; b: potential gas production; cb: Fermentation rate in fraction b; lag: Phase prior to initiating fermentation of the NDF; dDM: digestibility of dry matter; dOM: digestibility of organic matter; dNDF: digestibility of neutral detergent fiber; ME: metabolizable energy; ab: differences in the letters in each column indicate significant differences (P <0.05). SEM: Standard error of the mean.

Table 7: Correlations between the ruminal fermentation parameters at the three inclusion levels, digestibilities, ME and secondary metabolites.

	<i>a</i>	<i>ca</i>	<i>b</i>	<i>cb</i>	<i>Lag</i>	dDM	dOM	dNDF	ME	TPs	NPTs	TTs	CTs
<i>ca</i>	0.75												
	-0.34												
<i>b</i>	0.76	0.37											
	-0.33	1											
<i>cb</i>	0.59	0.62	0.3										
	0.58	0.53	-1.19										
<i>Lag</i>	0.75	0.72	0.19	0.05									
	0.34	-0.39	1.55	2.76									
dDM	0.85	0.85	0.84	0.26	0.57								
	-0.21	0.2	-0.21	1.3	-0.62								
dOM	0.72	0.44	0.04	0.14	0.06	0.89							
	-0.39	0.85	-3.01	-1.81	2.64	0.14							
Dndf	0.77	0.77	0.26	0.18	0.03	0.91	0.11						
	-0.32	0.31	-1.31	-1.63	3.45	-0.11	-2.08						
ME	0.71	0.44	0.04	0.15	0.06	0.92	0	0.1					
	0.39	-0.86	3.04	1.77	-2.62	-0.11	128.2	2.1					
TPs	0.86	0.53	0.11	0.08	0.01	0.85	0.03	0.01	0.03				
	-0.18	0.69	-2.06	-2.36	4.66	0.2	-3.34	-4.39	3.34				
NPTs	0.86	0.53	0.11	0.08	0.01	0.86	0.03	0.01	0.03	0			
	0.19	-0.7	2.06	2.32	-4.6	-0.18	3.32	4.43	-3.33	214			
TTs	0.86	0.53	0.11	0.08	0.01	0.85	0.03	0.01	0.03	0	0		
	0.18	-0.69	2.06	2.36	-4.66	-0.2	3.34	4.39	-3.34	15071	-214		
CTs	0.87	0.46	0.10	0.10	0.02	0.94	0.03	0.02	0.03	0	0	0	
	-0.17	0.83	-2.14	-2.09	3.63	0.08	-3.37	-3.73	3.38	-16.3	16.91	16.32	
FBCTs	0.70	0.82	0.43	0.54	0.20	0.75	0.48	0.1	0.47	0.29	0.29	0.29	0.38
	-0.41	-0.25	-0.87	-0.66	1.52	-0.34	-0.78	-2.14	0.79	-1.2	1.21	1.2	-0.98

a: Fermentation rate at 4 hours of fermentation (ml gas/g DM); ca: Fermentation rate in fraction a; b: potential gas production (ml gas/ g DM); cb: Fermentation rate in fraction b; lag: Phase prior to initiating fermentation of the NDF; dDM: digestibility of dry matter (g/kg DM); dOM: digestibility of organic matter (g/kg DM); dNDF: digestibility of neutral detergent fiber (g/kg DM); ME: metabolizable energy (MJ/kg DM); TPs: total phenols; NPTs: non-phenolic tannins; TTs: total tannins; CTs: condensed tannins; FBCTs: fiber-bound condensed tannins.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

Se comprobó el efecto negativo de los taninos sobre la fermentación ruminal al adicionar PEG al incrementar la producción de gas de las especies taníferas. En los tres niveles de inclusión de extracto a la dieta base; el nivel alto y medio afectan los parámetros de la cinética de fermentación y las digestibilidades. El nivel de inclusión bajo beneficio moderadamente estos parámetros evaluados, por lo que a bajas concentraciones los taninos sugieren efectos benéficos en los rumiantes.

X. LITERATURA CITADA

- Agricultural and Food Research Council (AFRC), 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, UK.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahl, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 212–227.
- Annison, E.F., Lewis, D., 1986. El metabolismo en el rumen. Hispanoamericana, México.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Barry, T.N., McNeil, D.M., McNabb, W.C., 2001. Plant secondary compounds; their impact on forage nutritive value and upon animal production. In: Proceedings of the XIX International Grassland Congress, Sao Paulo, Brazil, pp. 445–452.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145, 209–228.
- Blümmel, M., Ørskov, E.R., 1993. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.* 40, 109-119.
- Broudiscou, L.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. Tech.* 87,263–277.
- Broudiscou, L.P., Papon, Y., Broudiscou, A.F., 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Anim. Feed Sci. Tech.* 101,183–189.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2005. Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123/124,597–613.

- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89,761–771.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82, 3230–3236.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 2572–2579.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Szumacher-Strabel, M., 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim. Feed Sci. Tech.* 176, 102-106.
- Clausen, T.P., Provenza, F.D., Burritt, E.A., Reichardt, P.B., Bryant, J.P., 1990. Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *J. Chem. Ecol.* 16, 2381-2392.
- Dawson, J.M., Buttery, P.J., Jenkins, D., Wood, C.D., Gill, M., 1999. Effects of dietary Quebracho tannin on nutrient utilization and tissue metabolism in sheep and rats. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1423-1430.
- Ferme, D., Banjac, M., Calsamiglia, S., Busquet, M., Kamel, C., Avgustin, G., 2004. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia Microbiol. (Praha)* 49, 151–155.
- García, M.D., Wencomo, G.H., González, C.M., Medina, R.M., Cova, O.L., 2008. Caracterización de diez cultivares forrajeros de *Leucaena leucocephala* basada en la composición química y la degradabilidad ruminal. *Rev. MVZ Córdoba.* 13 (2), 1294-1303.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar H.P.S., Becker K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 72, 261-281.

- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. *Anim. Feed Sci. Tech.* 92, 51-57.
- Givens, D.I., Owen, E., Oxford, R.F.E., Omed, H.M., 2000. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, New York, E.U.
- Grafit, 1992. Data Analysis and Graphics Program Ver 3. Erithacus Software Ltd.
- Greathead, H., 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62:279-290.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253-261.
- Isaza, M.J.H., 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et. Technica.* 33 (13), 13-18.
- Jackson, F.S., Barry, T.N., Lascano, C., Palmer, B., 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forages legumes. *J. Sci. Food Agric.* 17 (1), 103-110.
- Jessop, N.S., Herrero, M., 1996. Influence of soluble components on parameter estimation using the *in vitro* gas production technique. *Anim. Sci.* 62, 626-627.
- Jiménez-Peralta, F.S., Salem, A.Z.M., Mejía-Hernández, P., González-Ronquillo, M., Albarrán-Portillo, B., Rojo-Rubio, R., Tinoco-Jaramillo, J.L., 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livest. Sci.* 136, 192–200.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Sahin, M., Gurbuz, Y., Ozkose, E., Ozkan, C.O., 2005. The effect of polyethylene glycol (PEG 8000) supplementation on *in vitro* gas production kinetics of leaves from tannin containing trees. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 35 (4), 229-237.

- Khazaal, K.A., Parissi, Z., Tsiouvaras, C., Nastis, A., Ørskov, E.R., 1996. Assessment of phenolics-related antinutritive levels using the in vitro gas production technique: a comparison between different types of polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol. *J. Sci. Food Agric.* 71, 405–414.
- Kumar, R., Vaithyanathan, S., 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.* 30, 21-38.
- Lanyasunya, T.P., Hongrong, W., Kariuki, S.T., Mukisira, E.A., Abdulrazak, S.A., Kibitok, N.K., Ondiek, J.O., 2008. The potential of *Commelina benghalensis* as a forage for ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 185-195.
- López, S., García-González, R., Fernández, M., Bodas, R., González, J.S., 2006. Medicinal plants as feed additives in animal nutrition. In: Singh, K.K., Govil, J.N., Ahmad, K., Sharma, R.Kr. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants*, Vol: 15. Natural Products. Studium Press LLC, Houston, TX, USA, pp. 309–333.
- Makkar, H.P.S., 2003a. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant. Res.* 49, 241–256.
- Makkar, H.P.S., 2003b. Chemical, protein precipitation and bioassays for tannins, tannin levels and activity in unconventional feeds, and effects and fate of tannins. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 1-42.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Becker, K., 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *Br.J. Nutr.* 73, 897-913.
- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P., Becker, C., 2007. *Plant Secondary Metabolites*. Human Press. Stuttgart, Germany.

- Makkar, H.P.S., Becker, K., 1996. A bioassay for tannins. In: Polyphenols Communications. Vol: 96. Proc. XVIIIth Int. Conf. on Polyphenols, Bordeaux, pp. 197-198.
- Martínez-Loperena, R., Castelán-Ortega, O. A., González-Ronquillo, M., Estrada-Flores, J. G., 2011. Nutritive value, *in vitro* fermentation and secondary metabolites of weeds and maize straw used for feeding dairy cattle. Trop. Subtrop. Agroecosyst. 14, 525-536.
- McDonald, P., Edwards, R.A, Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., 1998. Animal nutrition. 5a. ed. Longman Scientific Technical, Nueva York.
- McSweeney, C., Palmer, B., Bunch, R., Krause, D., 2001. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. J. Appl. Microbiol. 90, 78–88.
- McSweeney, C.S., Makkar, H.P.S., Reed, J.D., 2003. Modification of rumen fermentation to reduce adverse effects of phytochemicals. In: 't Mannelje, L., Ramírez Avilés, L., Sandoval Castro, C.A., K'ú Vera, J.C. (Eds.), Matching Herbivore Nutrition to Ecosystems Biodiversity. University of Yucatán, Mérida, México, pp. 239–268.
- Menke, H.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, 7-55.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider,W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedinstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. Cambridge. 93, 217-222.
- Minitab, 2000. Statistical software. User's guide 1: Data graphics, and macros Ver 14. USA.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z.A., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., Itabashi, H., 2004. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. J. Anim. Sci. 82,1839–1846.

- Montenegro, J.A.S., 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nítrico en sistemas de producción bovina en Costa Rica. In: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE – FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 334 p.
- Moreno-Murillo B., Sánchez, A., Quevedo, R., Pabón, M., Carulla, J. E. 2006. Estudio químico preliminar de los polifenoles de dos accesiones de *Calliandra calothyrsus*. Segundo Taller de Taninos en la Nutrición de Rumiantes. Universidad Nacional de Colombia-Bogota, pp. 10-12.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology*. 1, 151- 217.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000a. The effect of fermentable nitrogen availability on in vitro gas production and degradability of NDF. *Anim. Feed Sci. Tech.* 87, 241-251.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000b. The influence of diet of the donar animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. *Anim. Feed Sci. Tech.* 87, 231-239.
- NMX-F-615-NORMEX-2004. Alimentos. Determinación de extracto etéreo en alimentos. Método de prueba, (Método SOXHLET).
- Otero, M.J., Hidalgo, L.G., 2004. Condensed tannins in temperate forage species: effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites (a review). *Livest. Res. Rural Dev.* 16(2), 1-17.
- Owens, F.N., Goetsch, A.L., 1988. Fermentación ruminal. In: Church, C.D., El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. Acribia, España, pp. 159-183.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. Van Leeuw.* 96, 363-375.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 91, 24–37.

- Pell, A.N., Schofield, P., 1993. Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. J. Dairy Sci. 76, 1063-1073.
- Pinto-Ruiz, R., Hernández-Sánchez, D., Ramírez-Avilés, L., Sandoval-Castro, C. A., Cobos-Peralta, M., Gómez-Castro, H., 2009. Taninos y fenoles en la fermentación *in vitro* de leñosas forrajeras tropicales. Agronomía Mesoamericana. 20 (1), 81-89.
- Priolo, A., Waghorn, G.C., Lanza, M., Biondi, L., Pennisi, P., 2000. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. J. Anim. Sci. 78, 810-816.
- Ramírez, L.R.G., 2003. Nutrición de rumiantes: sistemas extensivos. Ed. Trillas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 304 pp.
- Ramírez, L.R.G., 2009. Forrajes nativos. Una alternativa sustentable en la alimentación de rumiantes. Ciencia UANL. 12 (1), 4-5.
- Ramírez, O.R., Ramírez, L.R.G., López, G.F., 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. Ciencia UANL. 5 (2), 180-189.
- Reed, J.D., Krueger, C., Rodríguez, G., Hanson, J., 2000. Secondary plant compounds and forage evaluation. In: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.), Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CAB International, pp. 433-448.
- Reed, J.D., 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J. Anim. Sci. 73, 1516-1528.
- Relling, A.E, Mattioli, G.A., 2002. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Universidad Nacional de la Plata y University of Ohio. EDULP. 72 pp.
- Rodríguez, R., Mota, M., Fondevila., Fuente, G., 2006. *In vitro* fermentation of four tropical browse legumes: estimation of the effect of tannins by gas production. In Sandoval-Castro, C.A., Hovell, D.F.D., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos., A. (Eds.), Herbivores: Assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Nottingham University Press.

- Sabás, C.C.C., 2010. Estudio etnobotánico y fitoquímico de *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae) en la comunidad de San Pablo Huantepec, Municipio de Jilotepec, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México pp. 73.
- Salem, A.Z.M., López, S., Robinson, P.H., 2012. Plant bioactive compounds in ruminant agriculture—Impacts and opportunities. *Anim. Feed Sci. Tech.* 176, 1-4 (special issue).
- Serge, Y.L., Avi, P., Dorit, K., Nissim, S., Ronit, N., Hagit, B., Frederick, D.P., 2002. Polyethylene glycol affects goats' feeding behavior in a tannin-rich environment. *J. Range Manage.* 55, 598–603.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 21-40.
- Steingass, H., 1983. Bestimmung des energetischen futterwertes von wirtschaftseigenen futtermitteln aus der gasbildung bei der panserfermentation in vitro. Hohenheim, Univ., Fak. IV, Diss.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., 1991. A new laboratory procedure for estimating kinetic parameters associated with the digestibility of forages. In: *Proceedings of the Conference on Plant Cell Wall Digestion*. US Dairy Forage Research Center. Madison, Wisconsin, p. 20.
- 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. Tech.* 48, 185-197.
- Tiemann, T.T., Ávila, P., Ramírez, G., Dieter, H.H., Lascano, C.E., 2006b. Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal. *Taller de Taninos en la Nutrición de Rumiantes*. Universidad Nacional de Colombia-Bogota, pp.15-17.
- Tsuda, T., 1994. Digestion and absorption. *Animal Physiology*. Tokyo, Japan. P. 149.

- Torres-Acosta, J.F.J., Alonso-Díaz, M.A., Hoste, H., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., 2008. Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 9 (1), 83-90.
- Van Soest, P.J., Conklin, N.L., Horvath, P.J., 1986. Tannins in food and feeds. *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufactures*, p 115-122.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., 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.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. Cornell Univ Press, Ithaca, NY, USA, p. 476.
- Waghorn, G.C., 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Tech.* 147, 116–139.
- Waghorn, C.R., Reed, J.D., Ndlovu, L.R., 1997. Condensed tannins and herbivore nutrition. Seccion 8- Tannins Plant Breeding and Animal Effects. *Proceedings of the XVIII. International Grassland Congress*. Canada, 1997.
- Yokoyama, M.T., Jonhson, K. A., 1988. Microbiología del rumen e intestino. In: Church, C.D., *El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición*. Acribia, España, pp. 137-156.

XI. ANEXOS

Efecto del Polietilen glicol (PEG) sobre la fermentación ruminal

Cuadro 1. Incremento en la producción de gas a las 24 y 96 h por tratamiento por especie

Especie	Tratamiento	PG 24 hrs (ml/g MS)	PG 96 hrs (ml/g MS)
<i>C. sulphureus</i>	-	77.95	107.55
	+	104.7	129.22
<i>C. bipinnatus</i>	-	109.03	140.55
	+	110.7	142.88
<i>T. lucida</i>	-	63.71	117.72
	+	96.71	123.89
<i>T. erecta</i>	-	117.44	144.7
	+	120.52	148.03
<i>M. diplotricha</i>	-	84.44	109.2
	+	90.69	116.2
<i>M. divaricatum</i>	-	65.46	77.39
	+	82.21	92.89

Efecto en la fermentación ruminal de tres niveles de inclusión de extracto de taninos en una dieta base para ganado lechero.

Figura 1. Comportamiento de la fracción a (ml gas/g MS) en los tres niveles de inclusión

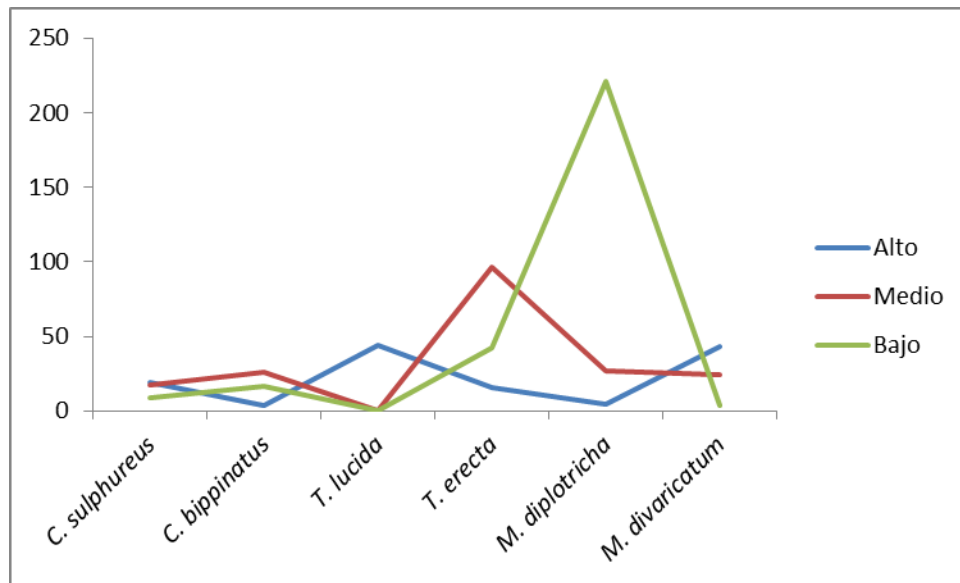


Figura 2. Comportamiento de la tasa de degradación (ca) de la fracción a (ml gas/g MS) en los tres niveles de inclusión

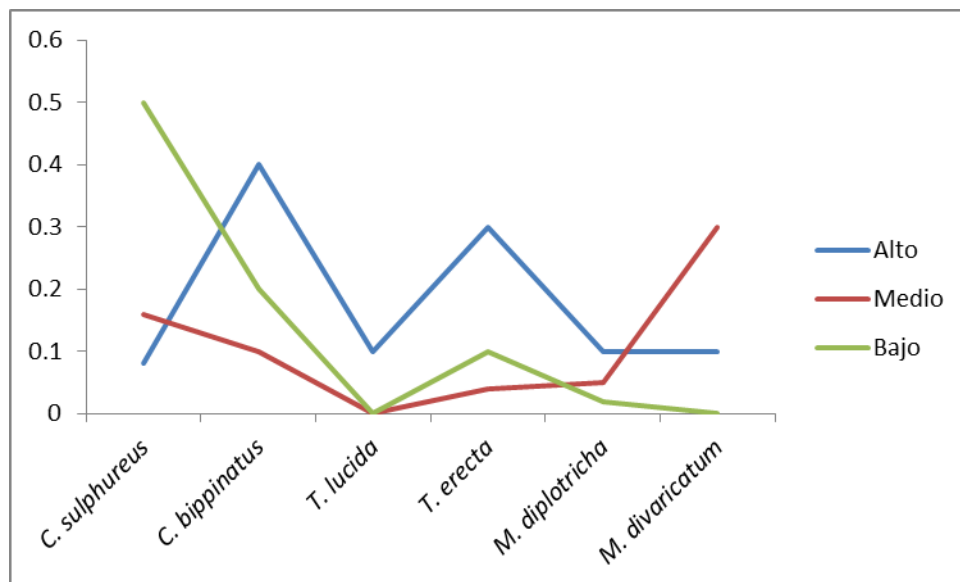


Figura 3. Comportamiento de la fracción b (ml gas/g MS) en los tres niveles de inclusión

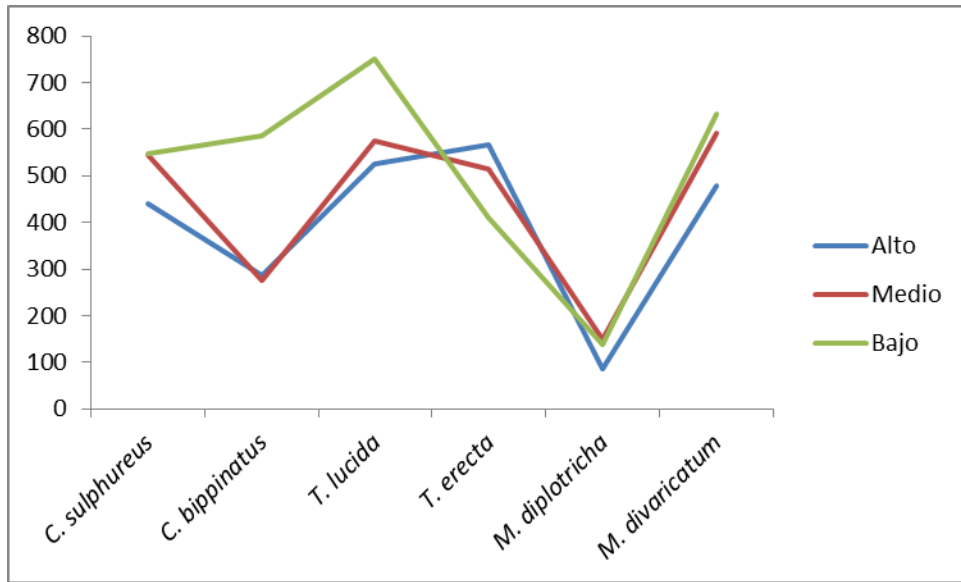


Figura 4. Comportamiento de la tasa de degradación (cb) de la fracción b (ml gas/g MS) en los tres niveles de inclusión

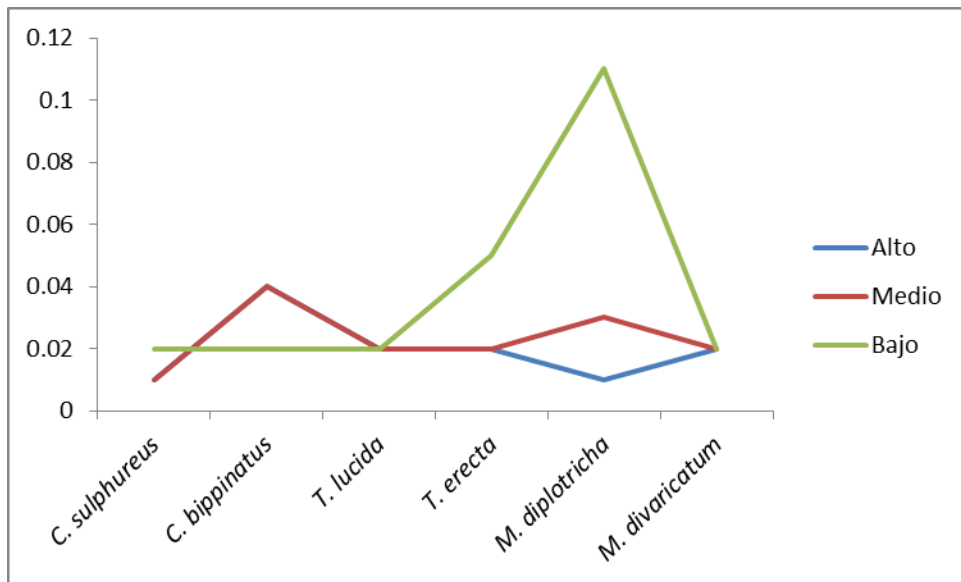
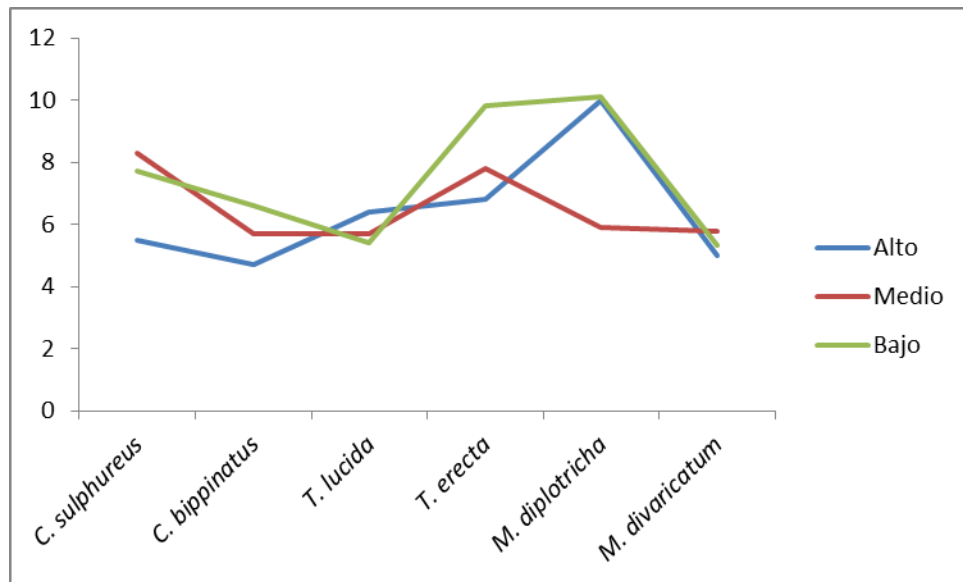


Figura 5. Comportamiento del tiempo Lag (ml gas/g MS) en los tres niveles de inclusión



Resumen publicado en las memorias del XV congreso Bienal de la Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal, A.C. Celebrado en Ixtapa, Zihuatanejo en Octubre de 2011.

EFFECTO DEL PEG EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* CON ESPECIES ALTAS EN TANINOS
(Nutrición de Rumiantes)

Matías GB*, Castelán OOA, González RM, Estrada FJG.
maty_era@hotmail.com

Introducción. Las arvenses son las plantas que se establecen entre los cultivos, crecen en forma espontánea en áreas agrícolas, y generalmente no causan daño. Estas son utilizadas para alimentar al ganado bovino y ovino principalmente, en combinación con pastoreo de besanas u ofrecidas directamente en los comederos. Algunas arvenses presentan compuestos secundarios, que cumplen funciones no esenciales en ellas, por ejemplo, intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Algunos compuestos secundarios son los taninos, los cuales han sido estudiados en leguminosas y arvenses, se dice que los taninos sobreprotegen la proteína de la dieta contra la fermentación en rumen, además de tener efectos negativos sobre enzimas y microorganismos de este. Un estudio revela que adicionando Polietilenglicol (PEG) (un inhibidor de los taninos) aumenta el consumo y la digestibilidad de plantas ricas en taninos; sin embargo, poco se sabe sobre esto por lo que es importante investigar la acción de los taninos condensados sobre la fermentación ruminal en las arvenses consumidas por el ganado bovino.

Material y métodos. Se utilizaron dos especies taníferas de la zona templada (Valle de Toluca), (*C. bippinatus* y *T. lucida*) y 4 especies de la zona semi-tropical (Tejupilco), (*C. sulphureus*, *T. erecta*, *M. diplotricha* y *M. divaricatum*) del Estado de México. El contenido de taninos se determinó por el método Folin-Cicalteoui (Makkar, 2003), además se les determinó el contenido de proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), (Van Soest, 1991) y cenizas. Se evaluó el efecto del polietilenglicol (PEG-6000) sobre la fermentación ruminal *in vitro* (Menke y Steingass, 1988) con especies altas en taninos.

Diseño experimental. Para evaluar el efecto del polietilenglicol (PEG) sobre la fermentación ruminal, se aplicó un diseño experimental de Bloques al azar, donde los tratamientos fueron la adición de PEG y sin PEG. Los bloques, fueron las 6 especies, con tres repeticiones. Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) se aplicó una comparación de medias de Tukey. Y las variables a evaluar fueron: producción de gas, digestibilidad de la fibra detergente neutro (dFDN), energía metabolizable (EM), y parámetros de la cinética de fermentación. Es importante resaltar que para el cálculo de la energía metabolizable se realizó un ajuste en la producción de gas a las 24 horas, ya que la fórmula para obtener la EM está diseñada para 200 mg de muestra, y en este experimento se utilizaron 500 mg de muestra.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$

Donde: Y_{ij} = Respuesta en la unidad experimental con el tratamiento, μ = Media general, τ_i = Efecto del tratamiento ($i=1,2$), β_j = Efecto del bloque ($j=1, \dots, 6$) y ε_{ij} = Error residual

Los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico de Minitab V14 (2000). Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) se aplicó la prueba de Tukey. Se utilizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Resultados y discusión. La cantidad de taninos condensados para cada especie fueron: *C. sulphureus* 13.7%, *C. bippinatus* 3.9%, *T. lucida* 7.7%, *T. erecta* 11.4%, *M. diplotricha* 1.7% y *M. divaricatum* 3.7%. Claramente se denota que las especies con mayor cantidad de taninos con *C. sulphureus*, *T. erecta* y *T. lucida*.

El cuadro 1 muestra el porcentaje de fibras contenidas en las especies, la fibra detergente neutro presenta valores altos en algunas especies, así mismo la fibra detergente ácido. *M. diplotricha* presenta un mayor nivel proteico, mientras *T. lucida* el menor.

Cuadro 1. Composición química (%) por especie

ESPECIES	FND	FAD	PC	Cenizas
<i>C. sulphureus</i>	33.54	26.67	13.75	8.88
<i>C. bippinatus</i>	45.53	31.73	13.74	8.78
<i>T. lucida</i>	42.66	29.64	8.51	7.26
<i>T. erecta</i>	24.46	17.43	11.78	10.08
<i>M. diplotricha</i>	47.86	34.68	16.77	6.38
<i>M. divaricatum</i>	42.58	29.33	11.13	6.38

FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, PC: proteína cruda

En el siguiente cuadro se puede observar el incremento de la producción de gas a las 24 y 96 horas, además de que al adicionar PEG hay una mejor digestibilidad y aporte de energía metabolizable, ya que a una mayor fermentación hay mayor liberación de EM.

Cuadro 2. Efecto del PEG sobre la producción de gas, digestibilidad y energía metabolizable

	PG 24hrs	PG 96hrs	dFND	EM
Tratamiento				
Con PEG	100.92b	125.5b	59.85a	7.62
Sin PEG	86.34a	116.2a	53.4a	6.93
EEM	5.3	3.11	2.6	0.25
p< 0.05	**	**	NS	**
Especies				
<i>C. sulphureus</i>	91.33 a	118.4a	65.27ae	7.15 ^a
<i>C. bippinatus</i>	109.87a	141.7be	59.03ab	8.08 ^a
<i>T. lucida</i>	80.21a	120.8ab	44.8b	6.59b
<i>T. erecta</i>	118.98a	146.4ce	77.54ac	8.56c
<i>M. diplotricha</i>	87.57a	112.7a	41.22db	6.97 ^a
<i>M. divaricatum</i>	73.84ab	85.1d	51.92eb	6.30 ^a
EEM	3.7	2.2	1.8	0.18
p<0.05	**	**	**	**

^{abcdef} Diferentes literales en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

PG: producción de gas (ml), dFND: digestibilidad de la fibra detergente neutro (%), EM: energía metabolizable (MJ/kg MS), EEM: error estándar de la media.

NS: no hay diferencias significativas, ** (p<0.05) existen diferencias significativas

Conclusiones. Se encontró un efecto del PEG sobre la fermentación ruminal, en las especies altas en taninos.

Implicaciones. El presente estudio pretende contribuir un poco a las investigaciones realizadas en esta área, pues aun no queda clara la acción de los taninos sobre la fermentación ruminal, y de esta manera buscar alternativas de alimentación de calidad al ganado.

Referencias. Makkar HPS. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. 2003. 1-42; Menke KH et al. 1988. Animal Research and Development 28:7-55; Minitab Version 14. 2000. Statistical software. USA. Van Soest PJ et al. 1991. Journal of Dairy Science 74:3583-3597.

Resumen publicado en las memorias del 13er congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria. Celebrado en El Colegio de Postgraduados, Campus Puebla el 18 y 19 de Octubre de 2012.

(6) Efecto en la fermentación ruminal *in vitro* de dietas utilizadas para ganado lechero, adicionadas con especies altas en taninos.

Beatriz Matías González.¹ Octavio A. Castelán Ortega.² Manuel González Ronquillo.² Julieta G. Estrada Flores.¹ ¹ ICAR-UAEM. ²FMVZ-UAEM.

Las arvenses son las plantas que se establecen entre los cultivos, estas son utilizadas para alimentar al ganado bovino y ovino principalmente. Estas plantas presentan compuestos secundarios como los taninos que cumplen funciones no esenciales en ellas. Los taninos han sido ampliamente estudiados y se dice que estos sobreprotegen la proteína de la dieta contra la fermentación en el rumen, además de tener efectos negativos sobre enzimas y microorganismos de este. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres niveles de inclusión de extracto de taninos en una dieta base sobre la fermentación ruminal. Material y métodos. Se utilizó el extracto de taninos de seis especies taníferas: *C. sulphureus*, *C. bippinatus*, *T. lucida*, *T. erecta*, *M. diplotricha* y *M. divaricatum*. El contenido de taninos se determinó por el método Folin-Cicalteu (Makkar, 2003) y el método de extracción fue por maceración (Sabas, 2010). Se evaluó el efecto de tres niveles de inclusión (alto, medio y bajo) de extracto de taninos en una dieta base sobre la fermentación ruminal *in vitro* (Theodorou, 1990). *Diseño experimental.* Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, donde los tratamientos fueron los tres niveles de inclusión, con tres repeticiones y los bloques fueron las seis especies, con tres repeticiones. Las variables a evaluar fueron los parámetros de la cinética de fermentación, la digestibilidad de la materia seca (dMS), digestibilidad de la materia orgánica (dMO), digestibilidad de la fibra detergente neutro (dFDN) y energía metabolizable (EM). La cinética de producción de gas se estimó por el modelo matemático propuesto por Jessop y Herrero (1996). Se utilizó el siguiente modelo estadístico: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$. Donde: Y_{ij} = Respuesta en la unidad experimental con el tratamiento, μ = Media general, τ_i = Efecto del tratamiento ($i=1,3$), β_j = Efecto del bloque ($j=1, \dots, 6$) y ε_{ij} = error residual. Los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico de Minitab V14 (2000). Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) se aplicó la prueba de Tukey. Resultados. La cinética de fermentación no mostró diferencias entre los niveles de inclusión ni entre las especies, únicamente se observaron diferencias entre las especies de la fracción b. La dMS, dMO, dFDN y EM tampoco mostraron diferencias entre los niveles de inclusión ni entre las especies; sin embargo, el nivel de inclusión donde se observó un limitado beneficio en la cinética de fermentación y en las digestibilidades fue el nivel de inclusión bajo. La EM se

mantuvo en todos los niveles de inclusión respecto a los valores originales de la dieta base.
Conclusiones. El nivel bajo de inclusión fue donde se observó un beneficio limitado en la cinética de fermentación, pero no en las digestibilidades ni en el aporte de energía metabolizable.