



**PRODUCCIÓN DE METANO UTILIZANDO PLANTAS TANIFERAS  
COMO SUBSTRATO EN FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* Y  
EFECTO DE EXTRACTOS FENÓLICOS EN LA MICROFLORA  
RUMINAL**

**[METHANE PRODUCTION UTILIZING TANINIFEROUS PLANTS AS  
SUBSTRATE IN RUMINAL FERMENTATION *IN VITRO* AND EFFECT OF  
PHENOLIC EXTRACTS ON RUMINAL MICROFLORA]**

**E. Andrade-Rivero<sup>1</sup>, A.R. Martínez-Campos<sup>1</sup>, O.A. Castelán-Ortega<sup>2</sup>,  
J. Ríos-Quezada<sup>3</sup>, Y. Pacheco-Ortega<sup>3</sup>, J.G. Estrada-Flores<sup>\*1</sup>.**

<sup>1</sup>*Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR),*

<sup>2</sup>*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,*

<sup>3</sup>*Facultad de Planeación Urbana y Regional*

*Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario No. 100,  
Colonia Centro, Toluca, Estado de México, C. P. 50000*

E mail: [jgestradaf@uaemex.mx](mailto:jgestradaf@uaemex.mx)

*\*Corresponding author*

**SUMMARY**

The use of forages rich in condensed tannins (TC) on ruminant diets is a strategy that has served for mitigating CH<sub>4</sub> emissions; however, the mechanism of action of such compounds in the rumen, has not been clarified. The antimicrobial effect of both, quebracho (*Schinopsis balansae*) condensed tannins (TCQ) and oregano oil (AO) on ruminal microflora was evaluated. Successively, TCQ, AO and tow taniferus plant species (*Mimosa diplotricha* L. 4.3% TC and *Tagetes erecta* 1.3% TC) were evaluated in a base diet (DB) at different inclusion levels (low, medium and high). The fermentation kinetic and CH<sub>4</sub> production was measured in an *in vitro* system. Results showed that the microorganisms' growth was inhibited by TCQ at 3% and AO at 555 ppm, highlighting their antibacterial properties. Diets showed crude protein values higher than 100 g/kg DM. The DB produced 63.9 ml/g DM of CH<sub>4</sub> at 48 h of incubation and treatments showed a range of 5.0 to 55.3 ml/ g DM of CH<sub>4</sub> (p<0.001). Seventy percent of CH<sub>4</sub> was produced at 24 h of incubation in the DB and treatments. Methane emission was reduced by the inclusion of taniniferous species and AO diminished CH<sub>4</sub> production convincingly; however, fermentation kinetics was affected by AO at high inclusion levels due to its antibacterial effect.

**Key words:** Methane; Ruminal fermentation; Taniferus plants; Tannins condensed

**RESUMEN**

El uso de forrajes ricos en taninos condensados (TC) en dietas para rumiantes es una estrategia que ha servido para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub>; sin embargo, la forma de actuar de estos compuestos en el rumen aún no está esclarecida. En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de TC de quebracho (TCQ) y aceite de orégano (AO) sobre la microflora ruminal, consecutivamente fueron evaluados una dieta base (DB) y la inclusión en ésta, de TCQ, AO y dos especies de plantas taníferas (*Mimosa diplotricha* L. 4.3% TC y *Tagetes erecta* 1.3% TC ) a diferentes niveles (bajo, medio y alto) de inclusión. Se determinó la cinética de fermentación y se cuantificó la producción de CH<sub>4</sub> en un sistema *in vitro*. Los TCQ al 3% y una concentración de 555 ppm de AO inhibieron el crecimiento de los microorganismos, demostrando propiedades antibacterianas. Las dietas presentaron valores de proteína cruda mayores a 100 g/kg MS. La DB produjo 63.9 ml/g MS de CH<sub>4</sub> a las 48 h de incubación y los tratamientos un rango de 5.0 a 55.3 ml/g MS (p<0.001). El 70% de CH<sub>4</sub> en la DB y tratamientos se generó a las 24 h de incubación. La inclusión de especies taníferas disminuyó la producción de CH<sub>4</sub> y el AO produjo una disminución contundente de CH<sub>4</sub>; pero a niveles altos afectó la cinética de fermentación por su efecto bactericida.

**Palabras clave:** Metano; Fermentación ruminal; Especies taníferas; Taninos condensados

## INTRODUCCIÓN

Después del bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el cual se emite en mayor medida por combustibles fósiles, el metano (CH<sub>4</sub>) es el gas de mayor importancia en el calentamiento del planeta, puesto que tiene un potencial de calentamiento de la tierra 23 veces superior al CO<sub>2</sub> (IPCC, 2001). De las emisiones de CH<sub>4</sub>, aproximadamente el 70% es de origen antropogénico, de el cual la ganadería es responsable del 25%, generado principalmente y de manera directa por la fermentación entérica e indirectamente por la descomposición anaeróbica del estiércol (Moss *et al.*, 2000). El gas CH<sub>4</sub> se emite como subproducto de la fermentación microbiana de los hidratos de carbono del alimento fundamentalmente en el rumen, dicho gas es energía alimenticia no aprovechada por el animal, representando en ciertas circunstancias valores mayores al 15% del total de la energía potencialmente consumida en la dieta (Makkar y Vercoe, 2007), es por eso que las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de metano.

Actualmente se están desarrollando estrategias de alimentación para minimizar las emisiones de CH<sub>4</sub>. Al respecto existen reportes donde se ha observado una baja emisión de CH<sub>4</sub> en evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando forrajes ricos en taninos condensados (TC). Por ejemplo incubaciones *in vitro* de una leguminosa tanífera *Lotus pedunculatus* (TC 0.10 g/100g de MS) y de *Medicago sativa* (TC < 0.001 g/100g de MS) con líquido ruminal por un periodo de 12 h, mostraron que la acumulación de CH<sub>4</sub> (ml/0.5 g de MS) para *M. Sativa* (12.5 ml) fue más alta que para *L. pedunculatus* (8.8 ml) (Tavendale *et al.*, 2005). Igualmente Animut *et al.* (2008) observaron una disminución en las emisiones de CH<sub>4</sub> en cabras alimentadas con *Lespedeza striata*, como forraje con una apreciable cantidad de TC (151 g/kg MS).

Es importante señalar que muchos de estos autores concuerdan que los TC tienen efecto directo sobre el alimento consumido por el ganado, principalmente formando enlaces con la proteína de la dieta (Tiemann *et al.*, 2008; El-Waziry *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2003). Sin embargo, la estructura del tanino, propia de un polifenol, pudiera presentar propiedades antibacterianas como cualquier otro fenol, por ejemplo: timol y carvacrol que son fenoles del aceite esencial de orégano (Skandamis y Nychas, 2001); o el anetol, compuesto polifenólico del anís (Kamel, 2001) y no actuar sobre la dieta consumida. Esta idea sugiere que los taninos pueden actuar sobre la microflora ruminal, provocando una disminución en su actividad fermentativa (O'Donovan y Brooker, 2001).

El aceite de orégano a pesar de que posee propiedades antimicrobianas probadas y al parecer puede actuar inhibiendo selectivamente a una parte de la población microbiana ruminal, en realidad no se conocen los efectos que puede tener este aceite esencial sobre el ecosistema microbiano ruminal (Castillejos, 2005) y por lo tanto sobre la producción de metano al incluirse a una dieta base.

En México los sistemas de ganadería en pequeña escala hacen uso de recursos naturales forrajeros, como vegetación nativa, para complementar la dieta del ganado, algunos de estos forrajes contienen TC. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue en una primera parte evaluar la actividad antimicrobiana de los TC sobre la microflora ruminal y consecutivamente evaluar en fermentación ruminal *in vitro* el efecto sobre la producción de CH<sub>4</sub> de la inclusión de TC, AO y dos especies de plantas taníferas nativas del sur del Estado de México.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Evaluación *in vitro* de taninos condensados

La actividad antimicrobiana de los TC se evaluó mediante el conteo total de microorganismos por el método de diluciones seriadas decimales en medio de cultivo agar triptona soja (TSA), determinando los porcentajes de inhibición de crecimiento de la microflora ruminal causado por cada concentración de TC, y finalmente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se define como la mínima concentración de ingrediente activo que inhibe el crecimiento visible de microorganismos después de 24 h de incubación a la temperatura óptima de crecimiento (Andrews, 2001).

El inóculo empleado fue líquido ruminal de dos vacas fistuladas de raza Limousin, alimentadas *ad libitum* con una dieta a base de 83% forraje y 17% concentrado, esto fue: 35.5% de heno de alfalfa, 48.4% de paja de avena, 12.9% de maíz molido y 3.2% de concentrado de soya. El líquido ruminal (pH de 6.9) se colectó manualmente del rumen y se filtró a través de cuatro capas de manta de cielo, posteriormente se almacenó en termos gaseados con CO<sub>2</sub> a 39 °C.

La CMI se determinó tanto para TC de quebracho (*Schinopsis balansae*) (MGM-C, UNITAN, Buenos Aires, Argentina), como para aceite de orégano (*Lippia graveolens*) (Agroindustrial Don Pablo, Chihuahua, México), con una concentración de 85.5% carvacrol / timol (fenoles antibacterianos). Las concentraciones (tratamientos) que se utilizaron de taninos condensados de quebracho (TCQ), fueron 1, 2, 3, 4 y 5%. Para el aceite de orégano (AO), las

concentraciones (tratamientos) fueron de 100 ppm hasta 900 ppm, con intervalos de 50 ppm. El control negativo se realizó sin ningún inhibidor.

El método consistió para cada tratamiento, en agregar a tubos de ensaye medio de cultivo líquido (Disolución salina peptonada, que es la mezcla de 10 g de peptona y 5 g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada), líquido ruminal (2 ml;  $1 \cdot 10^9$  ufc/ml) y la concentración de TCQ correspondiente. Esto se incubó en condiciones anaerobias durante 24 h a 39 °C, cada tratamiento se realizó por triplicado. Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la técnica de diluciones seriadas decimales de los cinco tratamientos, esta operación se realizó hasta obtener 5 diluciones, para que al final se tuviera una densidad bacteriana teórica de  $1 \cdot 10^3$  ufc/ml (Andrews, 2001). De las dos últimas diluciones de cada tratamiento ( $1 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^3$  ufc/ml) se tomaron 100  $\mu$ l y fueron sembrados por extensión en medio de cultivo agar triptona soja (TSA) en cajas petri. Las placas se incubaron durante  $24 \pm 2$  horas a 39 °C en condiciones anaerobias, transcurrido el periodo de incubación, se determinó el porcentaje de inhibición del posible crecimiento de las colonias bacterianas aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\# \text{ colonias control negativo} - \# \text{ colonias tratamiento}}{\# \text{ colonias control negativo}} \times 100$$

Los perfiles de inhibición de crecimiento *versus* concentración de inhibidor fueron expresados en porcentaje y se ajustaron a una ecuación sigmoidea de tres parámetros  $f = a / (1 + \exp(-(x-x_0)/b))$ . Donde  $a$  es la máxima inhibición alcanzada,  $x_0$  es el porcentaje de inhibición inicial,  $b$  es el tiempo en que se alcanza la máxima inhibición. Los ajustes se realizaron mediante el programa SigmaPlot, 2008.

### Selección de especies taníferas

La selección de las dos especies de plantas taníferas a ser evaluadas en fermentación ruminal *in vitro*, se realizó tomando en consideración en primera instancia el mayor índice de selección de las especies por el ganado y en segundo lugar que estas especies tuvieran un contenido alto de taninos condensados. En un trabajo previo, del grupo de investigación, se determinó que las especies con el mayor índice de selección en porcentaje fueron: *Zornia reticulata* 28.99%, *Ipomea orizabensis* 23.40%, *Pennisetum alopecuroides* Hameln 21.63%, *Dalea versicolor* 16.16%, *Tagetes erecta* 12.48%, *Mimosa diplotricha* L. 12.45%. La colecta de estas especies se realizó en tres potreros diferentes del municipio de Tejupilco, Estado de México, el periodo de muestreo comenzó en el mes de Agosto hasta Octubre del 2009, meses en los cuales las especies se encuentran en floración y

cuando tradicionalmente se utilizan para la alimentación del ganado. Una vez colectadas las muestras, fueron secadas en estufa de aire forzado a 30°C y molidas en un molino Willey a un tamaño de partícula de 1 mm y almacenadas a -4°C hasta su uso.

### Cuantificación de metabolitos secundarios

Los niveles de compuestos secundarios se determinaron en las seis especies, realizando los análisis por triplicado. La cuantificación de los fenoles totales (FT) y los taninos totales (TT) se realizó por el método de Folin-Ciocalteu con polivinilpirrolidona (Makkar, 2003); mientras que los taninos condensados (TC) se hizo mediante el método de nButanol/HCl (Makkar *et al.*, 2007).

### Evaluación de una dieta base en fermentación *in vitro*

En un experimento previo se comprobó que una dieta con buenos resultados en la producción de leche en vacas de la región sur del Estado de México fue con 60% de forraje y 40% de concentrado (López-González *et al.*, 2010). Dicha dieta fue utilizada en este experimento, el concentrado consistió en: 24% de maíz, 10.8% de soya, 4% de melaza y 1.2% de urea. El forraje fue pasto estrella de África (*Cynodon plectostachyus*). La producción total de gas y la cinética de fermentación se determinaron por la técnica de producción de gas *in vitro* empleando un transductor de presión y variantes del sistema descrito por Theodorou *et al.* (1994).

Aproximadamente 0.9999 g MS de la dieta fue incubada en botellas de vidrio con 90 ml de disolución amortiguadora y 10 ml de líquido ruminal teniendo una replica de tres botellas de cada muestra. El líquido ruminal fue obtenido de dos vacas fistuladas de raza Limousin, alimentadas *ad libitum* con la dieta descrita anteriormente. El líquido ruminal fue colectado y procesado tal como fue descrito en el apartado de evaluación *in vitro* de TC y AO. Una vez que se agregó la disolución amortiguadora y el inóculo a las botellas, éstas fueron incubadas a temperatura constante de 39 °C en baño maría por 48 h.

El volumen de gas generado dentro de las botellas se registró cada hora durante las primeras 8 horas, después cada 4 horas hasta las 24 y posteriormente a las 32, 40 y 48 h de incubación. Después del periodo de incubación los residuos fueron removidos para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica (dMO) y digestibilidad de la fibra detergente neutro (dFDN) mediante la técnica de Pell y Schofield (1993). El volumen total de gas se corrigió por diferencia con la producción de gas de los blancos

y además con la producción de gas del material rápidamente fermentable (fracción a), así como lo sugieren Herrero y Jessop (1996). Posteriormente el volumen acumulado de gas de cada una de las botellas se ajustó al modelo matemático propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991),  $PG = B(1 - \exp^{-c(t-lag)})$ . Donde  $PG$  es la producción total de gas (ml/g MS),  $B$  es la producción asintótica de gas de la fermentación de la FDN (ml),  $c$  la tasa de fermentación de la fracción FDN (h) y  $lag$  es la fase antes de iniciar la fermentación (h). Para la realización de los ajustes se utilizó el programa Grafit v3.

### Formulación de dietas con la inclusión de las especies taníferas

Los niveles de inclusión para cada tratamiento fueron: un nivel bajo de inclusión (-1), nivel medio de inclusión (0) y un nivel alto de inclusión (1).

Para el primer tratamiento se incubó una mezcla de la dieta base descrita anteriormente conteniendo la especie tanífera *Mimosa diplotricha* L. con 0.5% de TC como nivel bajo de inclusión, como nivel medio de inclusión se incubó una mezcla de la dieta con *Mimosa diplotricha* L. con 1.5% de TC y el nivel alto de inclusión constó de la mezcla de la dieta y *Mimosa diplotricha* L. con 2.5% de TC. Para el segundo tratamiento se realizó la inclusión de la segunda especie *Tagetes erecta* en los mismos niveles de inclusión 0.5% de TC, 1.5% de TC y 2.5% de TC. En el tercer y cuarto tratamiento fueron probados como niveles de inclusión los TCQ y el AO causantes de inhibición. En el caso de los TCQ las concentraciones fueron 1%, 2% y 3%; para el AO fueron 450 ppm, 500, 550 ppm. Los niveles de inclusión se ajustaron por peso y concentración de TC y fenoles a los 0.9999 g MS requeridos para el análisis de la producción de gas *in vitro* (Theodorou *et al.*, 1994).

El volumen de gas generado dentro de las botellas también se registró cada hora durante las primeras 8 horas, después cada 4 horas hasta las 24 y posteriormente a las 32, 40 y 48 h de incubación. Después del periodo de incubación los residuos fueron removidos para la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica (dMO) y digestibilidad de la fibra detergente neutro (dFDN) mediante la técnica de Pell y Schofield (1993). El volumen total de gas se corrigió por diferencia con la producción de gas de los blancos y además con la producción de gas del material rápidamente fermentable (fracción a), así como lo sugieren Herrero y Jessop (1996). El volumen acumulado de gas de cada una de las botellas se ajustó al modelo matemático propuesto por Krishnamoorthy *et al.* (1991). El contenido de nitrógeno tanto de la dieta base como el de la dieta con los respectivos niveles de

inclusión se obtuvo mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1984), el resultado se multiplicó por el factor 6.25 (AFRC, 1993) para obtener el contenido de proteína cruda (PC). El contenido de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinó mediante el método ANKOM, utilizando la técnica Van Soest *et al.* (1992). La energía metabolizable se determinó con la fórmula EM (MJ/kgMS) = (dMO)(0.0157) del AFRC (1993).

### Medición de la producción de metano en fermentación ruminal *in vitro*

La producción de CH<sub>4</sub> generado entre la mezcla de gases en el espacio de cabeza (EC) de las botellas conteniendo tanto la dieta base y la dieta con los niveles de inclusión se midió por cromatografía de gases. En el lote de incubación, las muestras (100 µl de gas), fueron tomadas directamente del espacio de cabeza a través del tapón de la botella con una jeringa de 1 ml. Este muestreo se realizó después de medir la producción de gas en cada botella (ya que esta información se utilizó para obtener la cinética de fermentación ruminal) con un transductor de presión sin liberar el respectivo gas; se asumió que la composición de gas fue igual al gas que se encontraba dentro de la botella. El gas fue colectado y analizado a las 8, 16, 24, 32, 40 y 48 h de incubación. Una vez tomada la muestra para la medición del metano se liberó el gas contenido en la botella.

La concentración de CH<sub>4</sub> en las muestras fue determinada con un cromatógrafo de gases SRI equipado con detector de ionización de flama (FID), y una columna empacada GRACE (CTR I: 6ft×1/4"). El gas de transporte fue nitrógeno y se utilizó un flujo de 25 ml/min, la temperatura del FID fue de 170 °C y la del horno 130 °C. Para la calibración del equipo se utilizó un estándar externo con una mezcla de: CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> todos a una concentración del 1% (MicromMAT-14). El tiempo de corrida fue de 8 min. Los picos fueron determinados por integración automática y el pico del metano fue identificado por su tiempo de retención.

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial completamente al azar, los tratamientos fueron dieta+*Mimosa*, dieta + *Tagetes*, dieta + TCQ y dieta +AO. El modelo general lineal utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk}$$

$Y_{ij}$  = Variable respuesta

$\mu$  = media general

$T_i$  = Efecto del factor tratamiento ( $i=1 \dots 4$ )

$B_j$  = Efecto debido al nivel de inclusión ( $j=1 \dots 3$ )

$eijk$ = Verdadero error contenido en el  $i$  ésimo nivel de inclusión del  $j$  ésimo tratamiento.

Las variables evaluadas fueron PC, FDN, FDA, dFDN, parámetros de fermentación y producción de metano.

Las emisiones de metano para cada especie evaluada se realizaron a través de un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos fueron los niveles de inclusión de los respectivos taninos. Se utilizó el siguiente modelo general lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijk}$$

$Y_{ij}$ = Variable respuesta

$\mu$ = media general

$T_i$ = Efecto del tratamiento ( $i=1\dots3$ )

$e_{ijk}$ = Verdadero error contenido en el  $i$  ésimo nivel de inclusión.

Las variables evaluadas fueron: dieta+*Mimosa*, dieta + *Tagetes*, dieta + TCQ y dieta + AO.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza, se expresaron en medias con su respectivo error estándar. Cuando se presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) se aplicó la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico de Minitab (v14).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles de inhibición de los TCQ mostrados en la figura 1a, indican que a dosis del 2%, se provoca 50% de inhibición del crecimiento de la microflora ruminal. Concentraciones del 1% no tuvieron un efecto significativo y la CMI se obtuvo al 3% de concentración (30 g de TC/kg de MS), (**Fig. 1a**), demostrándose así, que estos compuestos tienen un efecto inhibitorio en los microorganismos ruminales. Cabe destacar que el ganado puede tolerar ingestas de forraje con concentraciones de hasta 50 g de TC/kg de MS (5%), a dosis superiores los taninos afectan el crecimiento de los microorganismos, su reproducción y por tanto su actividad fermentativa (Lee *et al.*, 1992), y puede en algunos casos llegar a causar envenenamiento. Estos resultados muestran que concentraciones mayores de 3% de TCQ puros fueron letales para la microflora ruminal. Igualmente Tavendale *et al.* (2005) utilizando una fracción de TC de extracto de *Lotus pedunculatus* a una concentración final de 2.5 % en cepas metanogénicas, observaron una inhibición de la metanogénesis, manteniéndose incluso después de una semana de incubación. Según estos autores, los efectos, están relacionadas con la fuente, la cantidad y la

disponibilidad de los TC y muy probablemente el estado fisiológico del rumiante.

En los tratamientos con el AO la CMI se alcanzó a una concentración de 550 ppm (**Fig. 1b**); el 50% de inhibición se presenta a 500 ppm y concentraciones menores a 400 ppm no presentan efectos sobre el crecimiento de los microorganismos ruminales. Es preciso señalar que con dosis muy pequeñas de AO se tiene un efecto marcado en la flora ruminal, de hecho un estudio dosis-respuesta *in vitro*, realizado por Castillejos (2005), mostró que 50 mg/L de timol (fenol del aceite de orégano) no tenía efectos sobre la fermentación ruminal, pero a niveles de 500 mg/L los efectos eran tóxicos para los microorganismos. Así mismo, Evans y Martin (2000), han observado que el timol a dosis de 180  $\mu\text{g/ml}$  afectaba el metabolismo energético de *Streptococcus bovis* y *Selenomonas ruminantium* y por consecuencia causa una reducción en la concentración de metano y lactato. Estos resultados sugieren que el efecto bactericida encontrado en nuestros ensayos se debe a la fracción de timol presente en el aceite de orégano utilizado. Aunque a dosis diferentes los TCQ se comportaron de manera similar al control positivo, el cual es un bactericida ya probado en diversos estudios, se ratifica que los TCQ como polifenoles demuestran propiedades antibacterianas.

### Cuantificación de metabolitos secundarios

Los resultados muestran que *Mimosa diplotricha* L., tiene 4.3% de TC y 5.2% de TT, mientras que *Tagetes erecta*, sólo contiene 1.3% de TC a pesar de tener una cantidad considerable de taninos totales (7.3%) inclusive mayor que *M. diplotricha* L., concentraciones suficientes para lograr los niveles de inclusión de estos ensayos. Es preciso resaltar esto, ya que son los TC los que pueden tener beneficio en cuanto a una posible disminución en la producción de metano en rumiantes (Waghorn y Shelton, 1997). Así mismo, Clausen *et al.* (1990), afirman que los taninos de diferentes especies vegetales poseen diferentes propiedades físicas y químicas, las cuales podrían ser responsables de marcar variaciones en cuanto a un posible efecto en los rumiantes.

### Composición química

La composición química tanto de la dieta base como de la dieta con los respectivos niveles de inclusión de las plantas taníferas, los TCQ y el AO se muestran en el Cuadro 1. Se observó que el nivel de inclusión influyó en la composición química de la dieta, para el caso de la PC, a medida que incrementó el nivel de inclusión de *Mimosa* y *Tagetes*, el aporte de PC aumentó, en contraste con TCQ, en los que la PC disminuyó, para el caso de AO no se observan

diferencias. Los mayores contenidos de PC a la dieta se observaron con la inclusión de *Mimosa* en los tres niveles ( $p < 0.001$ ), de hecho en el tratamiento al nivel más alto de inclusión de *Mimosa* la PC fue superior al de la dieta base. En general las cuatro dietas presentaron valores de PC mayores a 100 g/kg MS.

Según Phelps (1990), la digestibilidad disminuye cuando los animales son alimentados con contenidos de PC menores al 7% debido a que la actividad microbiana en el rumen disminuye con la escasez de nitrógeno.

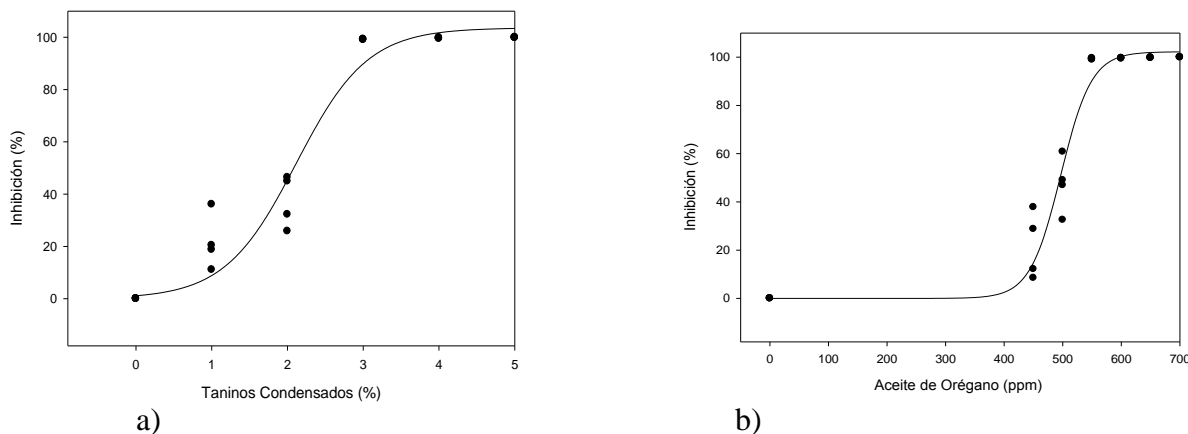


Figura 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) causadas por los TCQ y por el AO

Cuadro 1. Composición química, dMO, dFDN (g/kg MS) y EM (MJ/kg MS) de la dieta más el nivel de inclusión.

	PC	FDN	FDA	dFDN	dMO§	EM§
Dieta Base	167.5	458	156.9	631.1	655.1	10.3
Nivel de inclusión						
Nivel -1						
Dieta+ <i>Mimosa</i>	139.1 <sup>a</sup>	539.4 <sup>b</sup>	224.0 <sup>a</sup>	570.7 <sup>a</sup>	634.4	9.96
Dieta+ <i>Tagetes</i>	143.2 <sup>a</sup>	474.3 <sup>d</sup>	206.8 <sup>c</sup>	577.8 <sup>a</sup>	632.7	9.93
Dieta+TCQ	123.3 <sup>b</sup>	544.4 <sup>a</sup>	222.2 <sup>ab</sup>	553.6 <sup>ab</sup>	563.1	8.84
Dieta+AO	121.4 <sup>b</sup>	513.5 <sup>c</sup>	215.7 <sup>b</sup>	60.4 <sup>c</sup>	688.7	10.81
EEM	0.94	0.82	1.58	4.6		
$p <$	***	***	***	***		
Nivel 0						
Dieta+ <i>Mimosa</i>	158.3 <sup>a</sup>	521.2 <sup>b</sup>	227.3 <sup>a</sup>	613.3 <sup>b</sup>	622.1	9.77
Dieta+ <i>Tagetes</i>	157.5 <sup>a</sup>	411.4 <sup>d</sup>	165.7 <sup>b</sup>	634.6 <sup>a</sup>	712.8	11.19
Dieta+TCQ	113.6 <sup>b</sup>	535.8 <sup>a</sup>	179.0 <sup>c</sup>	551.4 <sup>c</sup>	555.4	8.72
Dieta+AO	120.9 <sup>c</sup>	503.8 <sup>c</sup>	186.6 <sup>b</sup>	61.9 <sup>d</sup>	340.8	4.51
EEM	1.37	1.61	1.38	5.63		
$p <$	***	***	***	***		
Nivel 1						
Dieta+ <i>Mimosa</i>	177.9 <sup>a</sup>	508.1 <sup>a</sup>	106.4 <sup>c</sup>	642.4 <sup>b</sup>	662.4	10.40
Dieta+ <i>Tagetes</i>	146.0 <sup>b</sup>	303.7 <sup>c</sup>	121.6 <sup>b</sup>	694.2 <sup>a</sup>	735.1	11.54
Dieta+TCQ	117.2 <sup>d</sup>	505.1 <sup>a</sup>	117.4 <sup>b</sup>	534.3 <sup>c</sup>	561.5	8.82
Dieta+AO	121.3 <sup>c</sup>	459.7 <sup>b</sup>	242.0 <sup>a</sup>	111.0 <sup>d</sup>	287.4	5.35
EEM	0.88	1.73	1.22	8.51		
$p <$	***	***	***	***		

<sup>abcd</sup> Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

\* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

TCQ: Taninos Condensados de Quebracho, AO: Aceite de Orégano, PC: Proteína Cruda, FDN: Fibra Detergente Neutro, FDA: Fibra Detergente Ácido, dMO: Digestibilidad de Materia Orgánica, dFDN: Digestibilidad de Fibra Detergente Neutro, EM: Energía Metabolizable, EEM: Error Estandar de la Media.

Nivel -1: Nivel bajo de inclusión, Nivel 0: Nivel medio de inclusión, Nivel 1: Nivel alto de inclusión. § Representa valores sin repetición

Para el caso de la FDN se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre tratamientos, mostrando que a medida que se incrementa la inclusión de *Mimosa* y *Tagetes* disminuye el aporte de FDN, lo cual indica que estas especies taníferas aportan proteína más que fibra.

La dFDN presentó los valores más bajos en los tres niveles de inclusión de AO ( $p < 0.001$ ), en contraste el aumento en los niveles de inclusión de *Mimosa* y *Tagetes* aumentó la dFDN, lo que podría estar relacionado con el mayor aporte de proteína de estas especies.

### Cinética de fermentación

Los parámetros de fermentación ajustados a la ecuación de Krishnamoorthy *et al.* (1991), se presentan en el Cuadro 2. En el caso del nivel bajo de inclusión, *B* no presentó diferencias significativas

( $p > 0.05$ ) en ninguno de los tratamientos; sin embargo, sus tasas de fermentación (*c*) si presentaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), el aceite de orégano logró disminuir la velocidad de fermentación de la FDN. No obstante si se compara la tasa de fermentación de alguna de las especies con la tasa de fermentación de la dieta base se observa que esta también disminuyó, según McSweeney *et al.* (2001b), los taninos en algunas especies forrajeras podrían retrasar la fermentación de la fibra mediante la formación de complejos con lignocelulosas o debido a la inhibición de los microorganismos celulolíticos, o ambos. En los niveles 0 y 1 la fracción *B* y *c* fue diferente entre tratamientos ( $p < 0.001$ ), se observaron las menores producciones potenciales de gas para TCQ y AO, el nivel alto de inclusión de TCQ favorece una lenta degradación del sustrato, mientras que el de AO produce el colapso del sistema.

Cuadro 2. Parámetros de fermentación en producción de gas *in vitro* en la dieta más el nivel de inclusión.

	<i>B</i> (ml/g MS)	<i>c</i> (h)	<i>Lag</i> (h)
Dieta Base	407.3	0.042	5.7
Nivel de inclusión			
Nivel -1			
Dieta+ <i>Mimosa</i>	375.6	0.034 <sup>a</sup>	5.5 <sup>b</sup>
Dieta+ <i>Tagetes</i>	436.1	0.033 <sup>a</sup>	5.6 <sup>b</sup>
Dieta+TCQ	376.3	0.040 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>
Dieta+AO	408.2	0.017 <sup>b</sup>	5.8 <sup>b</sup>
EEM	15.8	0.002	0.1
<i>P</i> <	NS	***	**
Nivel 0			
Dieta+ <i>Mimosa</i>	357.5 <sup>b</sup>	0.043 <sup>a</sup>	5.4
Dieta+ <i>Tagetes</i>	405.2 <sup>a</sup>	0.046 <sup>a</sup>	5.4
Dieta+TCQ	391.8 <sup>a</sup>	0.030 <sup>b</sup>	5.4
Dieta+AO	280.8 <sup>c</sup>	0.011 <sup>c</sup>	6.9
EEM	6.5	0.001	0.4
<i>P</i> <	***	***	NS
Nivel 1			
Dieta+ <i>Mimosa</i>	343.3 <sup>b</sup>	0.049 <sup>b</sup>	5.1
Dieta+ <i>Tagetes</i>	364.3 <sup>b</sup>	0.057 <sup>b</sup>	4.7
Dieta+TCQ	458.9 <sup>a</sup>	0.020 <sup>b</sup>	5.2
Dieta+AO	8.6c	0.403 <sup>a</sup>	5.1
EEM	18.2	0.018	0.1
<i>P</i> <	***	***	NS

<sup>abcd</sup> Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

NS, No significativo; \* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

TCQ: Taninos Condensados de Quebracho, AO: Aceite de Orégano, *B*: Producción potencial de gas (ml gas/ g MS), *c*: Tasa de fermentación de la fracción *b*, *Lag*: Fase antes de iniciar la fermentación de la FDN,

EEM: Error Estándar de la Media

Nivel -1: Nivel bajo de inclusión, Nivel 0: Nivel medio de inclusión, Nivel 1: Nivel alto de inclusión.

El tiempo de inicio de la fermentación de la fracción insoluble pero potencialmente fermentable (*Lag*) en los tres niveles presenta valores que van desde 4.7 hasta 6.9 h y sólo para el nivel bajo de inclusión se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre tratamientos.

### Medición de la producción de metano en fermentación ruminal *in vitro*

La cantidad total de  $\text{CH}_4$  producido en los tratamientos fue de 5.0 a 55.3 ml/g MS, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), siendo el AO a los tres niveles de inclusión quien presenta los valores más bajos de producción de metano, no hubo diferencias estadísticas para el resto de los tratamientos a ningún nivel (Cuadro 3). Se observó mayor producción de metano y producción de gas en *Tagetes* y *Mimosa* a medida que se incrementa el nivel de inclusión, este fenómeno puede deberse al incremento de la PC que se presenta en dichos tratamientos, lo cual estimula la actividad microbiana (Nolan, 1993) y puede encubrir el efecto bactericida de los taninos condensados aportados por estas especies. Aproximadamente la mitad del total de  $\text{CH}_4$  tanto en la dieta base como en los tratamientos se produjo entre las 8 y 24 h de incubación, y cerca del 70% se generó durante las primeras 24 h de incubación. En la dieta base el  $\text{CH}_4$  corresponde al 18% del total de gas producido durante toda la fermentación, en el caso de los tratamientos la proporción del  $\text{CH}_4$  generado con respecto al gas total producido fue del 13 al 16.4%. Según resultados de Tavendale *et al.* (2005), existen dos mecanismos por medio de los cuales los taninos condensados reducen la producción de metano en rumiantes: (1) indirectamente a través de la reducción en la digestibilidad de la fibra, con una disminución en la producción de  $\text{H}_2$ ; y (2) directamente a través de la inhibición de la metanogénesis. De acuerdo a los resultados para el nivel bajo de inclusión de *Mimosa* y *Tagetes*, se presenta una reducción aparentemente baja en la producción de gas total con respecto a la dieta base (menor del 11%), pero una reducción hasta del 39% en la producción de  $\text{CH}_4$ ; sin embargo, para estos tratamientos se presentan los valores más altos de dFND, lo que sugiere que el efecto fue en mayor medida sobre la inhibición de la metanogénesis. Los mayores efectos de reducción de gas en los tratamientos con TC se presentaron al nivel alto de inclusión, dando 24.1% de reducción en la producción total de gas y 47.7% en la producción de  $\text{CH}_4$ , en este caso la inhibición de la metanogénesis se debió al aporte de taninos contenidos en el tratamiento (Animut *et al.*, 2008). Para el caso del nivel medio de

inclusión de AO se obtuvo una reducción del 72% en el gas total producido y del 75% del  $\text{CH}_4$ . Para el nivel alto de inclusión del AO se observa que el sistema colapsó. Ya que tanto la producción de gas total como la de metano, se inhibieron drásticamente llegando a 98% y 92% respectivamente, resultados que concuerdan con el 98% de inhibición microbiana obtenidos en los ensayos *in vitro*.

En la etapa de la hora 16 a la hora 24, se observó la producción de  $\text{CH}_4$  más alta ( $p < 0.001$ ) durante toda la incubación. El incremento durante este período de fermentación, podría estar asociado con una elevada cantidad de fracción insoluble pero potencialmente fermentable, lo que sugiere que los altos contenidos de fibra en las dietas están relacionados con una alta producción de metano (Getachew *et al.*, 2005; Makkar y Vercoe, 2007). Los menores volúmenes de producción de  $\text{CH}_4$  se observaron en las horas 32, 40 y 48 de incubación para todos los tratamientos.

Para los tratamientos de *Mimosa*, *Tagetes* y TCQ se pudo notar que no existió efecto sobre producción de metano agregándolos en niveles de inclusión a la dieta ( $p < 0.05$ ), en promedio estos tratamientos generaron 43.1, 46.2 y 37.1 ml/g MS de metano respectivamente (Cuadro 4). Para el caso de la dieta con la inclusión de AO sí existió efecto entre niveles de inclusión sobre la producción total de metano ( $p < 0.01$ ). La dieta con un nivel alto de AO a pesar de obtener reducciones contundentes de metano se vio afectada drásticamente la digestibilidad de la FDN, la digestibilidad de la MO y en general la cinética de fermentación resultó disminuida. Sin embargo, un nivel bajo de inclusión de AO mostró buena composición química, una aceptable cinética de fermentación y una baja producción de metano (27.3 ml/g MS) comparada con la producción de metano de la dieta base o con alguno de los otros tratamientos.

### CONCLUSIONES

La inclusión de especies taníferas en la dieta base permite reducir la producción de metano comparada con las emisiones de la dieta base. En el caso de *Mimosa diplotricha*, *Tagetes erecta* y TCQ, estas no afectan la digestibilidad ni la cinética de fermentación ruminal y la inclusión de *Tagetes erecta* en el nivel alto mejoró la dFND. Los TC demostraron propiedades antibacterianas a diferentes dosis, mientras que la inclusión de aceite de orégano actuó como un bactericida en los niveles evaluados. Se debe considerar que los resultados que se presentan en este trabajo se obtuvieron a partir de evaluaciones *in vitro*.



Cuadro 3. Efecto del nivel de inclusión en la producción de metano (ml/g MS) en fermentación *in vitro*.

Tiempo (h)	Producción de metano						Producción total de metano	Producción total de gas
	8	16	24	32	40	48		
Dieta Base	11.9	13.6	23.8	4.5	6.0	3.6	63.9	348.6
Nivel de inclusión								
Nivel -1								
Dieta+ <i>Mimosa</i>	10.2 <sup>a</sup>	1.4	13.8 <sup>a</sup>	2.1	5.7	5.2	38.3 <sup>a</sup>	309.7 <sup>a</sup>
Dieta+ <i>Tagetes</i>	8.1 <sup>a</sup>	6.3	10.6 <sup>ab</sup>	5.0	3.2	5.8	39.0 <sup>a</sup>	329.6 <sup>a</sup>
Dieta+TC	5.4 <sup>b</sup>	9.5	10.0 <sup>ab</sup>	6.1	3.7	3.9	38.5 <sup>a</sup>	275.7 <sup>ab</sup>
Dieta+AO	9.7 <sup>a</sup>	2.0	2.5 <sup>b</sup>	6.0	5.4	1.6	27.3 <sup>b</sup>	210.1 <sup>b</sup>
EEM	0.9	1.91	2.2	1.4	1.9	1.4	2.3	18.5
<i>p</i> <	*	NS	*	NS	NS	NS	*	*
Nivel 0								
Dieta+ <i>Mimosa</i>	7.8 <sup>a</sup>	9.3 <sup>a</sup>	13.1 <sup>a</sup>	4.1	3.8 <sup>b</sup>	4.3	42.3 <sup>a</sup>	311.6 <sup>b</sup>
Dieta+ <i>Tagetes</i>	10.7 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>	11.9 <sup>a</sup>	2.7	3.5 <sup>bc</sup>	3.7	44.5 <sup>a</sup>	350.1 <sup>a</sup>
Dieta+TC	7.7 <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	2.9	1.9 <sup>c</sup>	5.0	39.7 <sup>a</sup>	290.7 <sup>b</sup>
Dieta+AO	1.4 <sup>b</sup>	2.4 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	1.4	6.4 <sup>a</sup>	2.6	15.9 <sup>c</sup>	96.9 <sup>c</sup>
EEM	1.0	1.5	1.3	0.8	0.4	1.7	1.4	6.3
<i>p</i> <	**	*	**	NS	***	NS	***	***
Nivel 1								
Dieta+ <i>Mimosa</i>	6.6 <sup>a</sup>	13.9 <sup>b</sup>	14.9 <sup>a</sup>	5.4	5.5 <sup>a</sup>	2.5	48.9 <sup>a</sup>	315.3 <sup>b</sup>
Dieta+ <i>Tagetes</i>	2.9 <sup>ab</sup>	21.4 <sup>a</sup>	16.5 <sup>ab</sup>	4.5	8.1 <sup>ab</sup>	1.9	55.3 <sup>a</sup>	364.7 <sup>a</sup>
Dieta+TC	8.5 <sup>a</sup>	6.8 <sup>c</sup>	11.1 <sup>a</sup>	2.3	2.6 <sup>a</sup>	2.1	33.4 <sup>a</sup>	264.5 <sup>c</sup>
Dieta+AO	0.5 <sup>b</sup>	0.4 <sup>d</sup>	2.3 <sup>ac</sup>	1.3	0.1 <sup>ac</sup>	0.4	5.0 <sup>b</sup>	8.6 <sup>d</sup>
EEM	1.3	1.4	3.1	1.7	1.4	0.6	5.0	4.7
<i>p</i> <	*	***	*	NS	*	NS	***	***

<sup>abcd</sup>Diferentes letras en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

NS, No significativo; \* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

TCQ: Taninos Condensados de Quebracho, AO: Aceite de Orégano

Nivel -1: Nivel bajo de inclusión, Nivel 0: Nivel medio de inclusión, Nivel 1: Nivel alto de inclusión.

Cuadro 4. Efecto del tratamiento en la producción de metano (ml/g MS) en fermentación *in vitro*.

Tiempo (h)	Producción de metano						Producción total de metano
	8	16	24	32	40	48	
Tratamiento							
Dieta + <i>Mimosa</i>							
-1	10.2	1.4 <sup>b</sup>	13.8	2.1	5.7	5.2	38.3
0	7.8	9.3 <sup>a</sup>	13.1	4.1	5.8	4.3	42.3
1	6.6	13.9 <sup>a</sup>	14.9	5.4	5.5	2.5	48.9
EEM	1.0	1.3	1.9	1.7	1.9	1.3	3.2
<i>P</i>	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Dieta + <i>Tagetes</i>							
-1	8.077 <sup>a</sup>	6.2 <sup>b</sup>	10.6	5.0	3.2	5.8	39.0
0	10.71 <sup>a</sup>	12.0 <sup>b</sup>	11.9	2.7	3.5	3.7	44.5
1	2.851 <sup>b</sup>	21.4 <sup>a</sup>	16.5	4.5	8.1	1.9	55.3
EEM	1.7	2.2	3.4	1.8	2.0	1.2	5.5
<i>P</i>	*	**	NS	NS	NS	NS	NS
Dieta+ TCQ							
-1	5.4	9.5	10.0	6.1	3.7	3.9	38.5
0	7.7	10.4	11.8	2.9	1.9	5.0	39.7
1	8.8	6.8	11.1	2.3	2.6	2.1	33.3
EEM	1.4	2.7	3.4	1.1	0.8	2.5	3.5
<i>P</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dieta + AO							
-1	9.7 <sup>a</sup>	2.0	2.5	6.0	5.4 <sup>a</sup>	1.6	27.3 <sup>a</sup>
0	1.4 <sup>b</sup>	2.4	1.6	1.4	6.4 <sup>a</sup>	2.6	15.9 <sup>b</sup>
1	0.5 <sup>b</sup>	0.4	2.3	1.3	0.2 <sup>b</sup>	0.4	5.0 <sup>c</sup>
EEM	0.7	0.7	1.0	1.5	1.5	0.6	2.2
<i>P</i>	***	NS	NS	NS	*	NS	**

<sup>abcd</sup> Diferentes letras en una misma columna presentan diferencias significativas (p<0.05)

NS, No significativo; \*(p< 0.05); \*\*(p<0.01); \*\*\* (p< 0.001)

TCQ: Taninos Condensados de Quebracho, AO: Aceite de Orégano

-1: Nivel bajo de inclusión, 0: Nivel medio de inclusión, 1: Nivel alto de inclusión.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Autónoma del Estado de México a través de los proyectos de investigación: “Determinación de las eficiencias de fermentación ruminal en arvenses y rastrojos de maíz utilizados para la alimentación del ganado lechero en el Valle de Toluca” Clave 2422/2007.

Al proyecto “Determinación de las características de fermentación ruminal de arvenses y plantas forrajeras nativas del altiplano central y efectos de sus metabolitos secundarios sobre la fermentación ruminal *in vitro*” Clave: PIFI FE058/2008. Financiado por la SEP.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al estudiante durante el periodo 2008-2010.

Se agradece a la Empresa INITAN por la donación del producto MGM-C (taninos condensados de quebracho).

## REFERENCIAS

- AFRC. 1993. Energy and Protein Requirements for Ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC technical committee on response to nutrients, CAB International, Wallingford, UK, 159 pp.
- Andrews, M. J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 5-16.
- 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. *Animal Feed Science and Technology*. 144: 212-227.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Ed Association of official Agricultural Chemists, Washington.
- Castillejos, L. V. 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis Doctoral en el programa de Producción Animal, departament de Ciència Animal I DELS ALIMENTS, Universitat Autònoma de Barcelona. pp. 76-82.
- Clausen, T. P., Provenza, F. D., Burritt, E. A., Reichardt, P. B. y Bryant, J. P. 1990. Ecological Implications of condensed tannin structure: a case study. *Journal of chemical Ecology*. 16: 2381-2392.
- El-Waziry, A. M., Nasser, M. E. A., Sallam, S. M. A., Abdallah, A. L. y Bueno, I. C. S. 2007. Processing Methods of Soybean meal 2. Effect of Autoclaving and Quebracho Tannin Treated-Soybean Meal on Gas Production and Rumen Fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Sciences Research*. 3: 17-24.
- Evans, J. D. y Martin, S. A. 2000. Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. *Current Microbiology*. 41: 336-340.
- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J., Taylor, S. J., Gisi, D. D., Higginbotham, G. E. y Riordan, T. J. 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 391-402.
- Grafit, 1992. Version 3. Data Analysis and Graphics Program. Erithacus Software Ltd.
- Herrero, M. y Jessop, N. S. 1996. Relationship between *in vitro* gas production and neutral detergent fibre disappearance in three tropical grasses. *Animal Science*. 62: 682.
- IPCC. 2001. Climate change 2001. The scientific basis. En: J.T. Houghton *et al.* (Eds.). Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press. Ginebra. 944 p.
- Kamel, C. 2001. Tracing modes of action and roles of plant extracts in non-ruminants. En: Garnsworthy, P. C. y Wiseman, J. Recent Advances in Animal. Nottingham. Univ. Press. OK.
- Krishnamoorthy, U., Soller, H., Steingass, H. y Menke, K. H. 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. *Journal Animal Physiology Animal Nutrition* 65: 28-35.
- Lee, J., Harris, P. M., Sinclair, B. R. y Treolar, B. P. 1992. The effect of condensed tannins containing diets on whole body amino acid utilization in Romney sheep: consequences or wool growth. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 52: 243-245.
- López-González, F., Estrada-Flores, J. G., Avilés-Nova, F., Yong-Ángel, Hernández-Morales, G., Martínez-Loperena, R., Pedraza-Beltran, P. E., Castelán-Ortega, P. 2010. Agronomic evaluation and Chemicals composition of african star grass (*Cynodon plectostachyus*) in the south of the

- state of Mexico. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 12: 1-9.
- Makkar, H. P. S. 2003. Chemical, protein precipitation and bioassays for tannins, tannin levels and activity in unconventional feeds, and effects and fate of tannins. En: Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 1-42.
- Makkar, H. P. S. y Vercoe, P. E. 2007. Measuring Methane Production from Ruminants. Springer. Dordrech, The Netherlands.
- Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., y Becker, K. 2007. Tannins. En: Plant Secondary Metabolites. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. pp. 67-79.
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNell, D. M. y Krause, D. O. 2001b. Microbial enteraction with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology. 91: 83-93.
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T. y McNabb, W. C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal Feed Science and Technology. 106:3-19.
- Minitab Version 14. 2000. Statistical software. User's guide1: Data graphics, and macros. USA
- Moss, A. R., Jovany, J., Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants; its contribution to global warming. Annales de Zootechnie. 49, 231-253.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen Kinetic. En: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Forbes, J. M., and J. F. France. CAB International. London, UK. 8-13.
- O'Donovan, L. y Brooker, J. D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolytus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*. 147: 1025-1033.
- Pell, A. y Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. Journal of Dairy Science. 76: 1063-1073.
- Phelps, A. 1990. Nitrógeno no proteico. Agricultura de las Américas. 90: 11-17.
- SigmaPlot, 2008. SigmaPlot for Windows Version 11.0 Build 11.0.0.77 Copyright © Systat Software, Inc.
- Skandamis, P. N., y Nychas, G.-J. E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. Journal of Applied Microbiology. 91: 1011-1022.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T., Sivakumaran, S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology. 123-124: 403-419.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllen, y France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology. 48: 185-197.
- Tiemann, T. T., Lascano, C. E., Wettstein, H.-R., Mayer, A. C., Kreuzer, M., y Hess, H. D. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra colothyrus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. The Animal Consortium. 2:5: 790-799.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1992. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74: 3583-3597.
- Waghorn, G. C. y Shelton, I. D. 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. Journal of Agricultural Science, Cambrich. 128: 365-372.

*Submitted october 22, 2011 – Accepted March 04, 2012*  
*Revised received July 18, 2012*