

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

VIỆN CHĂN NUÔI



PHẠM QUANG NGỌC

**SỬ DỤNG NGỌN LÁ CÂY THỨC ĂN CHỨA TANIN TRONG
KHẤU PHẦN ĐỂ GIẢM THIỂU PHÁT THẢI KHÍ MÊTAN
TRONG CHĂN NUÔI BÒ THỊT**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

CHUYÊN NGÀNH: CHĂN NUÔI

MÃ SỐ : 9 62 01 05

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: 1. TS. PHẠM KIM CƯỜNG

2. TS. NGUYỄN THÀNH TRUNG

HÀ NỘI, 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan, đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của các thầy và sự giúp đỡ của các đồng nghiệp trong suốt thời gian từ năm 2013 - 2019. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều có nguồn gốc rõ ràng.

Tác giả của luận án

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ của các thầy, cô giáo, các tập thể, cá nhân cùng bạn bè đồng nghiệp.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc tới các thầy hướng dẫn khoa học: TS. Phạm Kim Cương, TS. Nguyễn Thành Trung và cố GS.TS. Vũ Chí Cương. Các thầy đã tận tâm và nhiệt tình giúp đỡ, truyền đạt kiến thức chuyên môn, trao đổi phương pháp luận, ý tưởng và nội dung nghiên cứu, động viên nghiên cứu sinh để hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám đốc Viện Chăn nuôi, Phòng Đào tạo và Thông tin đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình học tập và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn tất các thủ tục bảo vệ luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn, TS. Chu Mạnh Thắng trưởng phòng Đào tạo và Thông tin và các cán bộ làm việc tại quý phòng. Đồng thời, tôi xin cảm ơn PGS.TS. Mai Văn Sánh, các cán bộ nghiên cứu tại Bộ môn Dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi, Trung tâm thực nghiệm và bảo tồn vật nuôi, Trung tâm nghiên cứu bò và đồng cỏ Ba Vì đã có nhiều trao đổi và giúp đỡ tôi trong việc hoàn thành luận án.

Nhân dịp này, tôi xin chân thành cảm ơn các cơ quan của tỉnh Ninh Bình đã tạo mọi điều kiện và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi xin được dành những tình cảm, lời cảm ơn sâu sắc nhất tới toàn thể người thân trong gia đình, bạn bè thân thiết, đặc biệt là vợ và các con của tôi đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành bản luận án này.

Nghiên cứu sinh

Phạm Quang Ngọc

MỤC LỤC

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu	2
3. Phạm vi nghiên cứu	3
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	3
5. Những đóng góp mới của luận án	3
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1. 1. SƠ LƯỢC VỀ TANIN	5
1.1.1. Cấu trúc hóa học của tanin	5
1.1.2. Đặc điểm sinh học của Tanin	8
1.2. ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN TANIN TRONG KHẨU PHẦN ĂN ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN VÀ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT CỦA GIA SÚC NHAI LẠI	9
1.2.1. Lượng thức ăn ăn vào	9
1.2.2. Khả năng tiêu hóa khẩu phần	11
1.2.3. Quá trình lên men ở dạ cỏ	11
1.2.4. Hiệu quả tích cực của tanin	13
1.2.5. Tác dụng của tanin trong chăn nuôi	16
1.3. QUÁ TRÌNH SẢN SINH KHÍ MÊTAN TRONG DẠ CỎ	17
1.4. MỘT SỐ GIẢI PHÁP GIẢM PHÁT THẢI KHÍ NHÀ KÍNH Ở GIA SÚC NHAI LẠI	19
1.4.1. Một số giải pháp chung giảm thiểu phát thải khí nhà kính	19
1.4.2. Một số giải pháp dinh dưỡng giảm thiểu phát thải khí nhà kính	20
1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC.....	39
1.5.1. Tình hình nghiên cứu giảm thiểu mêtan sinh ra từ chăn nuôi bò thịt ở trên thế giới	39
1.5.2. Tình hình nghiên cứu giảm thiểu mêtan sinh ra từ chăn nuôi bò thịt ở Việt Nam	45
1.6. GIỚI THIỆU MỘT SỐ CÂY CHỨA TANIN SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU	47

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
1.6.1. Lá chè (<i>Camellia sinensis</i>)	47
1.6.2. Lá keo tai tượng (<i>Acacia mangium</i> Wild)	47
1.6.3. Lá chè đại (<i>Trichanthera gigantea</i>)	48
1.6.4. Lá keo lá tràm (<i>Acacia auriculiformis</i>)	49
1.6.5. Lá cây keo dậu (<i>Leucaena leucocephala</i>)	50
1.6.6. Ngọn lá sắn (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	51
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	52
2.1. ĐỐI TƯỢNG, THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	52
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	52
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu	52
2.1.3. Thời gian nghiên cứu	52
2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	52
2.2.1. Xác định thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin cho gia súc nhai lại	52
2.2.2. Xác định ảnh hưởng của nguồn và mức bổ sung một số loại ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào chất nền đến tốc độ và đặc điểm sinh khí <i>in vitro</i> , lượng mêtan sản sinh, tỷ lệ tiêu hóa <i>in vitro</i> , giá trị năng lượng ME và lượng axit béo mạch ngắn	52
2.2.3. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào khẩu phần đến lượng mêtan phát thải tỷ lệ tiêu hóa và tích lũy nitơ ở bò lai Sind sinh trưởng	53
2.2.4. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin bổ sung vào khẩu phần đến phát thải mêtan, tăng khối lượng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn của bò lai Sind sinh trưởng	53
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	53
2.3.1. Xác định thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin cho gia súc nhai lại	53
2.3.2. Xác định ảnh hưởng của nguồn và mức bổ sung một số loại ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào chất nền đến tốc độ và đặc điểm sinh khí <i>in vitro</i> , lượng mêtan sản sinh, tỷ lệ tiêu hóa <i>in vitro</i> , giá trị năng lượng ME và lượng axit béo mạch ngắn	56
2.3.3. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào khẩu phần đến lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa và tích lũy nitơ ở bò lai Sind sinh trưởng	63

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
2.3.4. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin bổ sung vào khẩu phần đến phát thải mêtan, tăng khối lượng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn của bò lai Sind sinh trưởng	67
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	71
3.1. THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG CỦA MỘT SỐ NGỌN LÁ CÂY THỨC ĂN CHỨA TANIN	71
3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN VÀ MỨC BỔ SUNG MỘT SỐ LOẠI NGỌN LÁ CÂY THỨC ĂN GIÀU TANIN VÀO CHẤT NỀN ĐẾN TỐC ĐỘ VÀ ĐẶC ĐIỂM SINH KHÍ <i>IN VITRO</i> , LƯỢNG MÊTAN SẢN SINH, TỶ LỆ TIÊU HÓA <i>IN VITRO</i> , GIÁ TRỊ NĂNG LƯỢNG ME VÀ LƯỢNG AXIT BÉO MẠCH NGẮN	77
3.2.1. Thành phần hóa học của các khẩu phần thí nghiệm	78
3.2.2. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến lượng khí tích lũy của các khẩu phần thí nghiệm (ml)	80
3.2.3. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến động thái sinh khí <i>in vitro</i> của các khẩu phần thí nghiệm	83
3.2.4. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến tỷ lệ tiêu hóa <i>in vitro</i> , ME và SCFA của các khẩu phần thí nghiệm	87
3.2.5. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến lượng mêtan sản sinh ra sau 96 giờ ủ của các khẩu phần thí nghiệm	90
3.2.6. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung (nguồn tanin) trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện <i>in vitro</i>	98
3.2.7. Ảnh hưởng của mức tanin trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện <i>in vitro</i>	100
3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA BỔ SUNG NGỌN LÁ CÂY KEO DẬU VỚI CÁC TỶ LỆ KHÁC NHAU TRONG KHẨU PHẦN ĐẾN TỶ LỆ TIÊU HÓA, NITƠ TÍCH LŨY VÀ LƯỢNG MÊTAN PHÁT THẢI Ở BÒ LAI SIND SINH TRƯỞNG.....	102
3.3.1. Tỷ lệ tiêu hóa <i>in vivo</i> các thành phần dinh dưỡng có trong khẩu phần ..	102
3.3.2. Cân bằng nitơ ở bò được cho ăn các khẩu phần thí nghiệm	104
3.3.3. Lượng khí mêtan phát thải	106
3.4. KHẢ NĂNG TĂNG TRỌNG, HIỆU QUẢ SỬ DỤNG THỨC ĂN, PHÁT THẢI KHÍ MÊTAN VÀ HIỆU QUẢ KINH TẾ CỦA BÒ LAI SIND SINH TRƯỞNG KHI ĂN KHẨU PHẦN BỔ SUNG KEO DẬU VỚI CÁC TỶ LỆ	

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
KHÁC NHAU	108
3.4.1. Lượng thức ăn thu nhận của bò thí nghiệm	108
3.4.2. Khả năng tăng khối lượng của bò thí nghiệm	110
3.4.3. Hiệu quả sử dụng thức ăn của bò thí nghiệm	113
3.4.4. Phát thải khí mê-tan của bò thí nghiệm	114
3.4.5. Sơ bộ tính toán hiệu quả kinh tế	117
CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	119
4.1. KẾT LUẬN	119
4.2. ĐỀ NGHỊ	119
TÀI LIỆU THAM KHAM KHẢO	120
PHỤ LỤC	152

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

ABBH	Axit béo bay hơi
ADF	Xơ không tan trong dung môi axit
ADG	Tăng khối lượng bình quân/ngày
KTS	Khoáng tổng số
CP	Protein thô
CPD	Tiêu hóa protein
CRD	Ngẫu nhiên hoàn toàn
cs	cộng sự
CT	Tanin cô đặc
DM	Vật chất khô
DMI	Vật chất khô ăn vào
FCM	Sữa tiêu chuẩn
FCR	Hệ số chuyển đổi thức ăn
HT	Tanin thủy phân
ME	Năng lượng trao đổi
MPG	Lượng khí mêtan sản sinh trên mỗi kg tăng khối lượng
MRPG	Khả năng giảm thiểu khí mêtan sản sinh trên mỗi kg tăng khối lượng
NAN	Nitơ không phải từ amoniac
NDF	Xơ không tan trong dung môi trung tính
NDFD	Tiêu hóa NDF
OM	Chất hữu cơ
OMD	Tiêu hóa chất hữu cơ
RUP	Protein tiêu hóa không phân giải ở dạ cỏ
SCFA	Axit béo mạch ngắn
SEM	Sai số số trung bình
VCK	Vật chất khô

DANH MỤC BẢNG BIỂU

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
Bảng 2.1. Thành phần và tỷ lệ của khẩu phần cơ sở - chất nền	56
Bảng 2.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm	57
Bảng 2.3. Tỷ lệ các nguyên liệu thức ăn và giá trị dinh dưỡng của khẩu phần thí nghiệm <i>in vivo</i> (% VCK).....	63
Bảng 2.4. Sơ đồ thí nghiệm <i>in vivo</i>	64
Bảng 2.5. Sơ đồ thí nghiệm nuôi dưỡng	67
Bảng 2.6. Tỷ lệ các nguyên liệu thức ăn và giá trị dinh dưỡng của khẩu phần thí nghiệm (% VCK).....	68
Bảng 3.1. Thành phần hóa học của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin (% theo VCK)	71
Bảng 3.2. Tốc độ sinh khí <i>in vitro</i> gasproduction, giá trị năng lượng và tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin.....	73
Bảng 3.3. Hàm lượng tanin và nồng độ mêtan sản sinh sau 96h ủ một số ngọn lá cây thức ăn giàu tanin trong điều kiện <i>in vitro</i>	75
Bảng 3.4. Thành phần hóa học của các khẩu phần thí nghiệm (%VCK)..	77
Bảng 3.5. Lượng khí tích lũy của các khẩu phần thí nghiệm (ml)	80
Bảng 3.6. Động thái sinh khí của các khẩu phần thí nghiệm	84
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của loại lá và hàm lượng tanin tổng số đến tỷ lệ tiêu hóa <i>in vitro</i> , giá trị năng lượng trao đổi (ME) và số lượng các axit béo mạch ngắn (SCFA) của các khẩu phần thí nghiệm	87
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của loại lá và hàm lượng tanin tổng số đến nồng độ và thể tích khí mêtan sản sinh ra sau 96 giờ ủ.....	90
Bảng 3.9. Kết quả phân tích phương sai cho các biến của phương trình 1	93
Bảng 3.10. Kết quả phân tích phương sai cho các biến của phương trình 2 ..	94

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
Bảng 3.11. Kết quả xác định ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin tổng số bổ sung đến nồng độ và thể tích khí mêtan sản sinh ra sau 96 giờ ủ bằng phương pháp GC và NaOH ..	95
Bảng 3.12. Kết quả phân tích phương sai thứ bậc cho các loại phương trình	97
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung (nguồn tanin) trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện <i>in vitro</i>	99
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của mức tanin (g/kg VCK) trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện <i>in vitro</i>	101
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu đến tỷ lệ tiêu hóa <i>in vivo</i>	102
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu đến cân bằng nitơ (g/ngày)	104
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến khí CH ₄ sản sinh	106
Bảng 3.18. Lượng thu nhận thức ăn của bò nuôi với các khẩu phần có bổ sung các mức tanin khác nhau từ ngọn lá cây keo dậu	108
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu đến khối lượng bò qua các tháng thí nghiệm.....	110
Bảng 3.20. Hiệu quả sử dụng thức ăn	113
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến CH ₄ thải ra	115
Bảng 3.22. Sơ bộ ước tính hiệu quả kinh tế	117

DANH MỤC HÌNH

<u>Nội dung</u>	<u>Trang</u>
Hình 1.1. Cấu trúc tanin thủy phân có $n+2$ flavan 3-ol subunits	6
Hình 2.2. Cấu trúc tanin cô đặc Pentagalloylglucose	6
Hình 3.1. Tốc độ sinh khí qua các thời điểm lên men <i>in vitro</i> gasproduction của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin.....	74
Hình 3.2. Tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (OMD) của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin (%).	75
Hình 3.3. Giá trị năng lượng (ME) của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin (MJ)	75
Hình 3.4. Hàm lượng tanin của các lá cây nghiên cứu	76
Hình 3.5. Nồng độ mêtan sản sinh sau 96h ủ một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin trong điều kiện <i>in vitro</i>	77
Hình 3.6. Phương trình bậc hai mô tả quan hệ giữa lượng CH_4 xác định bằng phương pháp GC và phương pháp thể tích dùng NaOH....	97
Hình 3.7. Phương trình hồi qui tuyến tính bậc nhất mô tả quan hệ giữa lượng CH_4 xác định bằng phương pháp GC và phương pháp thể tích NaOH	98
Hình 3.8. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ ngọn lá cây keo dậu đến lượng nitơ tích lũy	105
Hình 3.9. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến khí mêtan phát thải tính trên 100 kg khối lượng cơ thể	107
Hình 3.10. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến khí mêtan phát thải trên 1 kg khối lượng trao đổi	107

Hình 3.11. Sinh trưởng tương đối (%) của bò thí nghiệm	111
Hình 3.12. Sinh trưởng tuyệt đối (g/con/ngày) của bò thí nghiệm.....	111
Hình 3.13. Hiệu quả sử dụng thức ăn (kg VCK/tăng khối lượng) của bò thí nghiệm	114
Hình 3.14. Lượng CH ₄ sản sinh của bò thí nghiệm.....	115
Hình 3.15. Lượng CH ₄ sản sinh/1kg tăng khối lượng của bò thí nghiệm....	116

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Các khí nhà kính chủ yếu gây nên hiện tượng ấm lên trên toàn cầu hiện nay bao gồm khí cacbonic, oxit nitơ, metan và CFC (Cloruafluorocarbons), trong số các loại khí này thì metan (CH_4) là loại khí có ảnh hưởng đứng thứ 2 trong việc gây ra hiệu ứng nhà kính. Nguồn phát thải khí thải metan vào khí quyển từ chăn nuôi gia súc nhai lại chiếm 12-41% từ các nguồn trong sản xuất nông nghiệp (Afzalani và cs., 2015). Metan (CH_4) được sản xuất bởi một nhóm vi sinh vật riêng biệt được gọi là *Methanogenic Archaea* (Chaban và cs., 2006). Metan xuất hiện trong quá trình lên men các vật chất hữu cơ của thực vật chủ yếu ở dạ cỏ, do đó số lượng phát ra có liên quan chặt chẽ với lượng thức ăn được ăn vào và tiêu hoá.

Chiến lược thay đổi khẩu phần ăn cho gia súc nhai lại để giảm thiểu phát thải khí metan đã được xem xét rộng rãi (Grainger và cs., 2011). Một số nghiên cứu thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* đã được thực hiện để giảm thiểu phát thải khí thải metan, bao gồm bổ sung thức ăn tinh hỗn hợp (Bhatta và cs., 2009), lipid (Carulla và cs., 2005), axit hữu cơ (Chadwick và cs., 2011; D'Mello, 2000), tinh dầu (Evans và Martin, 2000) chế phẩm sinh học probiotics và prebiotics (Fuller và Johnson, 1981; Carulla và cs., 2005). Các hợp chất kháng sinh như monensin và lasalocid cũng đã được sử dụng để giảm sản sinh metan (Goel và cs., 2008).

Cho đến nay, tiềm năng về nghiên cứu và sử dụng các hợp chất tự nhiên trong thực vật như tanin, saponin và tinh dầu (essential oil) đang được quan tâm. Ngoài việc dùng làm phụ gia thức ăn chăn nuôi để tăng khả năng sản xuất của gia súc (Herawaty và cs., 2013; Jayanegara và cs., 2012) thì

chúng còn có tác dụng làm giảm lượng khí thải mêtan (Jayanegara và cs., 2009) do tanin thể ức chế trực tiếp phát thải khí mêtan nhờ quá trình ức chế nhóm vi khuẩn methanogenic (Calsamiglia và cs., 2007).

Tanin, còn được gọi là polyphenol, có khả năng hoạt động như các chất chống methanogenic trong dạ cỏ. Hiệu quả sử dụng tanin phụ thuộc nhiều vào loại và liều lượng tanin. Tanin trọng lượng phân tử thấp là chất ức chế vi khuẩn methanogen hiệu quả hơn so với tanin trọng lượng phân tử cao hơn, vì chúng hình thành liên kết mạnh hơn với các enzyme của vi sinh vật (Kumar và Vaithiyanathan, 1990; Ningrat và cs., 2017).

Việt Nam có gần 6 triệu bò, trong đó chủ yếu là bò thịt, cũng góp phần không nhỏ vào phát thải khí mêtan và hiệu ứng nhà kính, trong khi những hiểu biết về công nghệ tác động để giảm thiểu phát thải khí mêtan ở bò thịt vẫn còn hạn chế, vì vậy nghiên cứu sử dụng ngọn lá cây thức ăn chứa tanin trong khẩu phần để giảm thiểu phát thải khí mêtan trong chăn nuôi bò thịt là cần thiết.

2. Mục tiêu

- Xác định được ảnh hưởng của nguồn và mức bổ sung một số loại ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào chất nền đến tốc độ và đặc điểm sinh khí *in vitro*, lượng mêtan sản sinh, tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, giá trị năng lượng (ME) và lượng axit béo mạch ngắn.
- Xác định được ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin hợp lý trong khẩu phần đến lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa và tích lũy nitơ của bò lai hướng thịt.
- Xây dựng khẩu phần có bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin hợp lý cho giảm phát thải mêtan ra môi trường trong khi vẫn cho tăng trọng tốt và hiệu quả sử dụng thức ăn cao trong chăn nuôi bò lai hướng thịt.

3. Phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện trên 6 loại cây thức ăn chứa tanin làm thức ăn cho gia súc nhai lại. Thí nghiệm được thực hiện chủ yếu tại Bộ môn dinh dưỡng và thức ăn chăn nuôi; Trung tâm thực nghiệm và bảo tồn; Trung tâm nghiên cứu bò và đồng cỏ Ba Vì (Viện Chăn nuôi) trên đối tượng là bò lai Sind sinh trưởng.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

- Đề tài luận án đã xác định được thành phần hóa học, giá trị dinh dưỡng của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin trồng phổ biến ở Việt Nam và ảnh hưởng của nguồn và mức bổ sung từng loại cây vào chất nền đến tốc độ và đặc điểm sinh khí *in vitro*, lượng mêtan sản sinh, tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, giá trị năng lượng (ME) và hàm lượng axit béo mạch ngắn.

- Đã xác định được ảnh hưởng của mức bổ sung thân lá cây keo dậu vào khẩu phần đến lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa, tích lũy nitơ, tăng khối lượng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn của bò lai Sind sinh trưởng.

- Đã xây dựng khẩu phần có bổ sung ngọn lá cây keo dậu với tỷ lệ hợp lý cho giảm phát thải mêtan ra môi trường mà vẫn cho tăng khối lượng cao, chuyển hóa thức ăn tốt của bò lai Sind sinh trưởng để áp dụng trong sản xuất.

- Kết quả nghiên cứu của đề tài luận án là tài liệu tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo, làm tài liệu giảng dạy cho các cơ sở đào tạo, các cơ quan khuyến nông và người chăn nuôi áp dụng.

5. Những đóng góp mới của luận án

- Đã xác định được ảnh hưởng của mức bổ sung thân lá cây keo dậu vào khẩu phần đến lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa, tích lũy nitơ, tăng khối lượng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn của bò lai Sind sinh trưởng.

- Đã xây dựng khẩu phần có bổ sung ngọn lá cây keo dậu hợp lý cho

giảm thiểu lượng mêtan thải ra môi trường, tăng khối lượng và chuyển hóa thức ăn tốt của bò lai Sind sinh trưởng áp dụng trong sản xuất.

– Đã xây dựng được phương trình hồi quy thể hiện mối quan hệ giữa hai phương pháp xác định mêtan bằng sắc ký khí (Gas chromatography-GC) và phương pháp thể tích với NaOH từ đó đưa ra khuyến cáo sử dụng phương pháp xác định mêtan bằng thể tích NaOH trong điều kiện không có trang thiết bị GC đắt tiền.

CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

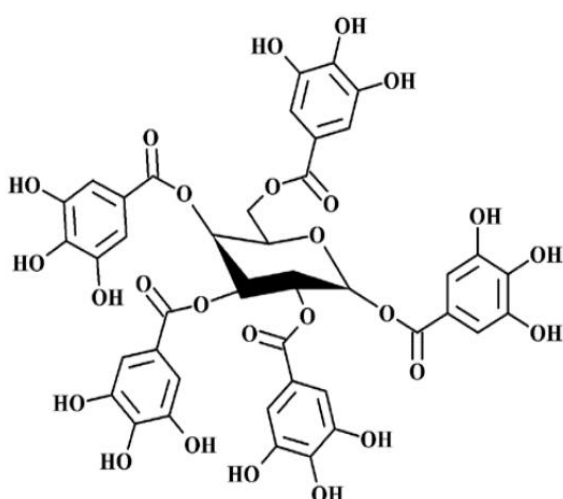
1.1. SƠ LƯỢC VỀ TANIN

Tanin là các hợp chất thực vật thứ cấp polyphenolic, nó đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật trong quá trình lên men, phân giải protein, sản sinh khí mêtan và giảm thiểu mầm bệnh lây truyền qua thực phẩm. Tanin là một nhóm các hợp chất hóa học được sản xuất từ một số nhóm cây lá rộng, chúng có thể liên kết với protein. Nồng độ tanin cao hơn thường thấy trong cây lá rộng ở vùng khí hậu ẩm áp (Jennifer và cs., 2013). Thực vật có chứa các hợp chất thứ cấp khác nhau để bảo vệ không cho nấm, vi khuẩn, động vật ăn cỏ, côn trùng và động vật có xương sống tấn công. Các lớp hợp chất được biết để hoạt động theo cách này bao gồm *saponin* và *tanin* (Makkar và cs., 1995; Pell và cs., 2001), phổ biến trong nhiều loại cây thức ăn gia súc vùng nhiệt đới. Tanin là hợp chất oligomeric với nhiều đơn vị cấu trúc có các nhóm phenolic tự do. Tanin thường hòa tan trong nước (Haslam, 1982) ngoại trừ một số có cấu trúc cao phân tử. Chúng cũng có khả năng liên kết với protein và hình thành phức hợp tanin-protein hòa tan và không hòa tan. Dựa trên cấu trúc và tính chất hóa học của chúng (Athanasiadou và cs., 2000), tanin thường được chia thành hai nhóm, tanin thủy phân (hydrolyzable tanins - HT) và tanin cô đặc (proanthocyanidin hay Condensed Tanins - CT).

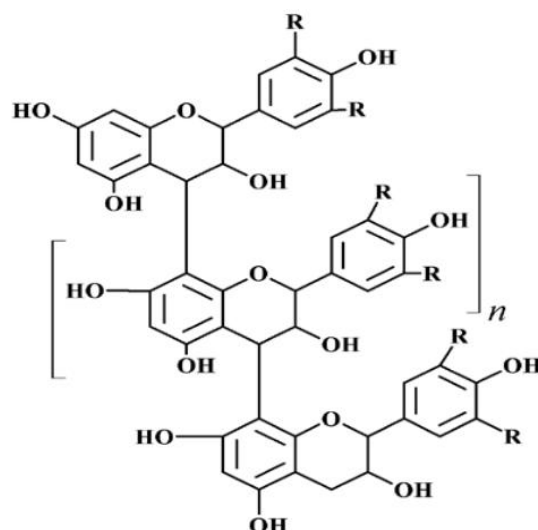
1.1.1. Cấu trúc hóa học của tanin

Như đã đề cập ở trên, tanin là các hợp chất oligomeric, polyphenolic, thường có khối lượng phân tử cao và tích lũy trong nhiều loại thực vật như là sản phẩm tự nhiên của quá trình chuyển hóa thực vật thứ cấp (Caygill và Mueller-Harvey, 1999). Qua đó cho thấy tanin có sự đa dạng về cấu trúc giữa các loài thực vật khác nhau nhưng một đặc điểm mà hầu hết các loại tanin đều có là khả năng kết tủa protein. Tanin có thể được chia theo cấu trúc hóa học

thành hai nhóm quan trọng: tanin thủy phân (tanin thủy phân) và tanin cô đặc (CT). Tanin thủy phân là polyesters của đường (chủ yếu là glucose) và axit gallic hoặc ellagic (Hình 1.1) và thường được coi là bất lợi cho dinh dưỡng động vật (Serrano và cs., 2009). Tanin cô đặc là các polyme của flavan-3-ols (Hình 1.2). Chúng tạo thành anthocyanidin đầy màu sắc khi phân tách oxy hóa (đun nóng khi có axit) và do đó còn được gọi là proanthocyanidin. Mỗi polymer CT có thể bao gồm nhiều tiểu đơn vị flavan-3-ol trong đó phổ biến nhất là catechin và epicatechin hoặc gallocatechin và epigallocatechin tạo thành procyanidin hoặc prodelfphinidin.



Hình 1.1: Cấu trúc tanin thủy phân có $n+2$ flavan 3-ol subunits



Hình 1.2: Cấu trúc tanin cô đặc Pentagalloylglucose

1.1.1.1. Tanin thủy phân (Hydrolyzable Tanins)

Tanin thủy phân là các phân tử carbohydrate thường là có dạng D-glucose nằm trung tâm của lõi. Các nhóm hydroxyl của nhóm carbohydrate là một phần hoặc tổng este tổng số trong các nhóm phenolic tương tự như axit gallic (gallotannins) hoặc axit ellagic (ellagitannins). Thông thường trong thực vật có hàm lượng tanin thủy phân (Mueller-Harvey, 2001). Các loại tanin dạng này thường thấy ở các cây họ sồi (*Quercus spp.*) keo, bạch đàn, chồi và ngọn lá các loại cây (Waghorn và McNabb, 2003). Chồi của những lá non có

ở khắp nơi chiếm khoảng 200 g/kg vật chất khô (DM) và một số loài có thể chứa trên 500g tanin thủy phân/kg DM (Reed, 1995; Lowry và cs., 1996). Tanin thủy phân mang mối tiềm ẩn độc tố cho gia súc, nhưng phần lớn gia súc nhai lại có thể tự điều chỉnh được nồng độ tanin dạng này (Waghorn và McNabb, 2003). Gia súc nhai lại có thể tự điều chỉnh độc tố từ tanin bằng cách giảm bài tiết nước tiểu khi tiêu hóa chúng vì thế cho phép chúng tiêu thụ khẩu phần ăn (Lowry và cs., 1996). Mặc dù gia súc nhai lại có khả năng điều chỉnh như trên nhưng khi lượng tanin thủy phân vượt quá mức cho phép trong khẩu phần có thể gây các tổn thương cho gan và thận thậm chí gây chết (Waghorn và McNabb, 2003). Hiện tượng gia súc chết thường xuất hiện trong khoảng thời gian 5-10 ngày khi thu nhận khẩu phần; cho đến nay, hợp chất độc tố vẫn chưa được biết. Thông tin đáng quan tâm về tiêu hóa, hấp thu và ảnh hưởng của tanin thủy phân đến trao đổi chất còn thiếu.

1.1.1.2. Tanin cô đặc (Condensed Tanins)

Sự hiện diện của tanin cô đặc trong các loài cỏ có ý nghĩa trong thực hành nuôi dưỡng đó là bảo vệ (chống) protein thực vật tiêu hóa dạ cỏ theo đó tăng lượng protein hấp thu ở ruột non theo đó nâng cao khả năng sản xuất (Piluzza và cs., 2013). Tanin cô đặc được phân phối dưới nhiều dạng nhưng chủ yếu dưới dạng oligomers hoặc polymers là các hợp chất phenol tồn tại dưới dạng tự nhiên có các cầu nối carbon (C) khác nhau nên không thể dễ dàng tách phân tử bằng thủy phân (Waghorn và McNabb, 2003) (Reed, 1995). Chúng được gọi là tanin cô đặc do có cấu trúc hóa học ngưng tụ. Chúng cũng được gọi là proanthocyanidin (PA), có nguồn gốc từ phản ứng oxy hóa xúc tác axit tạo ra anthocyanidin đỏ thông qua đun nóng PA trong dung dịch rượu axit (Haslam, 1982). Cyanidin (Procyanidin) và delphinidin (prodelphinidin) là những anthocyanidin phổ biến nhất được sản xuất (Reed, 1995). Tanin cô đặc có thể chứa ít nhất hai hoặc lớn hơn 50 đơn vị hợp chất phenol. Do sự

thay đổi các đơn vị hợp chất phenol để cho một số nhóm thay thế vào các vị trí này tạo ra các liên kết xen kẽ nên các polyme tanin cô đặc (ngưng tụ) có cấu trúc phức tạp. Tanin cô đặc có thể hoặc không thể hòa tan trong dung môi hữu cơ, tùy thuộc vào cấu trúc hóa học và mức độ trùng hợp của chúng.

Thức ăn thô chứa tanin có lợi ích khác nhau tùy thuộc vào loài cây đối với gia súc nhai lại. Ví dụ, cây hoa sen đã chứng minh là có lợi trong việc ngăn ngừa chướng hơi (Beddows, 1956). Các tanin cô đặc khác đã có hiệu quả trong việc cải thiện mức độ tăng trọng (Waghorn và cs., 1999). Ở cừu, chúng đã được chứng minh là làm tăng protein sữa (Wang và cs., 1996), cải thiện tỷ lệ đẻ (Min và cs., 1999), và giảm nhiễm trùng đường tiêu hóa (Niezen và cs., 1995) và sản sinh mêtan (Waghorn và cs., 2002).

1.1.2. Đặc điểm sinh học của Tanin

Tanin được biết đến về mặt chức năng nhờ khả năng liên kết với protein tạo cơ sở cho nhiều tác dụng sinh học của tanin (Hagerman và Butler, 1991). Chúng có thể gây bất lợi cho nhiều vi sinh vật và nấm (Bernays và cs., 1989) có thể đây là một trong những lý do chính trong sự tiến hóa của chúng (Swain, 1979; Bernays và cs., 1989; Ayres và cs., 1997; Aerts và cs., 1999). Tanin đã được chứng minh là có tác động đến hoạt động của vi sinh vật gây ảnh hưởng đến quá trình lên men, phân giải protein, sản xuất mêtan và có khả năng giảm thiểu mầm bệnh truyền qua thực phẩm. Sự tích tụ mạnh mẽ hàm lượng tanin xảy ra trong lớp biểu bì của lá và thân ở nhiều loại cây cỏ thân thảo, thân mộc và cỏ với các nồng độ khác nhau bao gồm *Onobtychis Abbeylifolia* (sainfoin), *Lotus (L.) corniculatus* (birdsfoot trefoil), *Hedysarum coronarium* (sulla) và *Lespedeza cuneata* (sericea lespedeza) (Jones và cs., 1977; Terrill và cs., 1989, 1992). Thực vật lá rộng thích nghi với khí hậu ẩm áp thường có nồng độ tanin cao hơn so với thực vật vùng khác (MacAdam và

cs., 2013). Các nhóm hợp chất được biết đến là saponin và tanin (Makkar và cs., 1995; Pell và cs., 2001), chúng phổ biến trong nhiều loại cây thức ăn cho gia súc ở nhiệt đới. Điều thú vị cho thấy rằng, thực vật có lượng tanin cao hơn tạo ra ít lá hơn so với những cây có tanin thấp (Coley, 1986).

1.2. ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN TANIN TRONG KHẨU PHẦN ĂN ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN VÀ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT CỦA GIA SÚC NHAI LẠI

Tanin có thể có lợi hoặc bất lợi cho động vật nhai lại, tùy thuộc vào mức độ ăn vào, cấu trúc hợp chất và khối lượng phân tử và sinh lý của từng loài gia súc nhai lại (Hagerman và cs., 1992).

1.2.1. Lượng thức ăn ăn vào

Gần đây, hầu hết các nhà nghiên cứu cho rằng tanin trong khẩu phần làm giảm lượng thức ăn ăn vào. Khi gia súc ăn các loài thực vật có hàm lượng tanin cô đặc (Condensed Tanins - CT) cao với mức >50 g/kg vật chất khô, đã làm giảm đáng kể lượng thức ăn ăn vào, trong khi đó mức ăn vào ≤ 50 g /kg vật chất khô thì dường như không ảnh hưởng đến chỉ tiêu này (Barry và Duncan, 1984; Barry và Manley, 1984; Waghorn và cs., 1994a). Tác dụng của tanin thủy phân (Hydrolyzable Tanins - HT) cũng đã được nhiều báo cáo đề cập tới mức độ biến động về lượng thức ăn ăn vào, chủ yếu phụ thuộc vào lượng tiêu thụ. McSweeney và cs. (1988) đã quan sát thấy lượng thức ăn ăn vào ở cừu giảm không đáng kể ($P>0,05$) khi được nuôi khẩu phần bổ sung lá cây *Terminalia oblongata*, có hàm lượng HT thấp (34 g/vật chất khô). Tuy nhiên, việc giảm lượng ăn vào đã xảy ra khi những con cừu này ăn khẩu phần bổ sung lá cây *Clidemia hirta*, một loại cây bụi có hàm lượng HT cao (>50 g/kg vật chất khô). Frutos và cs. (2004) không tìm thấy giảm lượng thức ăn ăn vào ở cừu nuôi khẩu phần có chứa bột đậu tương được xử lý bằng HT (20,8 g HT/kg chất khô khẩu phần).

Có ba cơ chế chính được đưa ra để giải thích những tác động tiêu cực của nồng độ tanin cao đối với lượng thức ăn ăn vào đó là: (i) giảm tính ngon miệng của thức ăn; (ii) làm chậm quá trình tiêu hóa và (iii) gia tăng các phản ứng có điều kiện. Giảm khả năng ngon miệng thông qua phản ứng giữa tanin và mucoprotein nước bọt, hoặc qua phản ứng trực tiếp với cơ quan cảm nhận vị giác, gây ra cảm giác làm se da (McLeod, 1974). Các phức hợp tanin-proline giàu protein được hình thành, không giống như các phức hợp protein-tanin khác, chúng ổn định trên tất cả các độ pH khác nhau của đường tiêu hóa. Có thể trong suốt quá trình tiến hóa, động vật ăn cỏ đã phát triển các cơ chế thích nghi khác nhau để tiêu thụ thực vật giàu tanin (Leinmüller và cs., 1991; Hagerman và cs., 1992; Narjisse và cs., 1995). Động vật liên tục tiết ra protein giàu proline, trong khi cừu chỉ tiết ra khi ăn thực vật giàu tanin (Austin và cs., 1989).

Tuy nhiên, ở bò không có sự gia tăng sản sinh các protein như vậy khi ăn thức ăn chứa tanin, mặc dù các protein khác có ái lực cao với các polyphenol này được tìm thấy trong nước bọt của chúng (Makkar và Becker, 1998). Đối với cơ chế thứ hai, theo Narjisse và cs., (1995) khi truyền tanin trực tiếp vào dạ cỏ để xác định xem các yếu tố độc lập với tính ngon miệng có chịu trách nhiệm trong việc giảm lượng thức ăn ăn vào hay không. Làm chậm quá trình tiêu hóa chất khô trong dạ cỏ từ đó làm giảm sự trống rỗng của đường tiêu hóa, theo đó tạo ra các tín hiệu cung cấp phản hồi tới trung tâm thần kinh liên quan đến kiểm soát lượng ăn vào của động vật, điều này có thể ảnh hưởng đến lượng thức ăn ăn vào nhiều hơn là giảm mức độ ngon miệng (Waghorn và cs., 1994a).

1.2.2. Khả năng tiêu hóa khẩu phần

Tanin chủ yếu gây ảnh hưởng đến protein, nhưng cũng gây ảnh hưởng đến các thành phần khác trong thức ăn ở các mức độ khác nhau (Kumar và Singh, 1984). Tác dụng chính của chúng đối với protein là dựa trên khả năng hình thành liên kết hydro (H) ổn định giữa độ pH nằm trong khoảng 3,5 và xấp xỉ 8. Các phức hợp này ổn định ở pH dạ cỏ khi độ pH giảm xuống dưới 3,5 (như ở dạ múi khế, pH 2,5-3) hoặc lớn hơn 8 (ví dụ ở tá tràng, pH 8), điều này đã lý giải nhiều hơn về hoạt tính của tanin trong đường tiêu hóa (McLeod, 1974; Mangan, 1988; Hagerman và cs., 1992). Rõ ràng, các sửa đổi về khả năng tiêu hóa gây ra do tiêu hóa tanin chủ yếu liên quan đến những thay đổi về mô hình lên men trong dạ cỏ, cùng với những thay đổi về khả năng tiêu hóa ở đường ruột. Điều đáng nói ở đây là, có bằng chứng cho thấy khi tăng hàm lượng tanin trong khẩu phần thì tanin làm giảm khả năng tiêu hóa thức ăn và làm tăng bài tiết nitơ trong phân. Nghiên cứu của Silanikove và cs., (1994) trên cừu chỉ ăn lá cây Minh quyết (*Ceratonia siliqua*) (nồng độ tanin = 50 g/kg chất khô) cho thấy cừu bị giảm khối lượng và bài tiết nhiều protein trong phân hơn so với lượng thức ăn thu nhận. Tuy nhiên, điều quan trọng nhận thấy rằng việc tiêu hóa tanin bao gồm tăng tiết protein nội sinh như glycoprotein nước bọt, chất nhầy và các enzyme tiêu hóa cũng như tăng tiết dịch tế bào đường ruột (Mehansho và cs., 1987; Waghorn, 1996). Do đó, việc tăng nitơ trong phân có thể là do tăng nitơ chuyển hóa vào phân, tức là nitơ có nguồn gốc nội sinh không biểu hiện sự sụt giảm lượng protein được hấp thụ từ thức ăn.

1.2.3. Quá trình lên men ở dạ cỏ

Ảnh hưởng rõ rệt của tanin là làm giảm quá trình phân giải protein dạ cỏ (Hagerman và cs., 1992; Mueller-Harvey và McAllan, 1992). Ái lực của

tanin với các phân tử protein rất lớn kết hợp với độ pH của môi trường dạ cỏ đã thúc đẩy việc hình thành các phức hợp tanin-protein. Nhìn chung, trong trường hợp giảm mức độ phân giải protein liên quan đến việc sản sinh từ nitơ amoniac thấp hơn và lượng nitơ phi amoniac lớn hơn đến tá tràng (Barry và Manley, 1984; Waghorn và cs., 1994b; Waghorn, 1996). Về cơ bản, tác dụng của tanin trong việc giảm nhanh chóng phân giải protein đó là làm giảm ngay lập tức tốc độ và tỷ lệ phân giải các đoạn cấu trúc (Aharoni và cs., 1998; Frutos và cs., 2000; Hervás và cs., 2001). Mặc dù tanin chủ yếu tác động lên protein, nhưng chúng cũng có tác động đến carbohydrate, đặc biệt là hemicellulose, cellulose, tinh bột và pectin (Barry và Manley, 1984; Chiquette và cs., 1988; Leinmüller và cs., 1991) nên tác động của tanin đối với phân giải xơ được xem là yếu tố kháng dinh dưỡng thứ cấp. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng khi gia súc ăn thức ăn giàu tanin thì phân giải xơ trong dạ cỏ giảm đáng kể (Barry và McNabb, 1999; McSweeney và cs., 2001).

Tanin cũng là tác nhân tạo chelat, điều này có thể làm giảm một số ion kim loại sẵn có cần thiết cho quá trình chuyển hóa của vi sinh vật dạ cỏ (Scalbert, 1991). Liên quan đến ức chế enzyme, tanin có thể phản ứng với các enzyme của vi khuẩn và nấm gây ức chế hoạt động của chúng (Makkar và cs., 1988; Mueller-Harvey và McAllan, 1992; McAllister và cs., 1994a; McSweeney và cs., 2001). Theo Leinmüller và cs. (1991); O'Donovan và Brooker, (2001) tanin làm thay đổi hoạt động của các vi khuẩn phân giải protein, xơ và các enzyme khác, nhưng điều quan trọng là sự liên kết của tanin với enzyme - cho dù là của vi khuẩn hoặc nội sinh từ đó ức chế chúng (Makkar và cs., 1988). Đối với các enzyme phân giải xơ, CT dễ dàng ức chế hoạt động của hemicellulase hơn cellulase (Waghorn, 1996). Điều này lý giải vì sao phần lớn các báo cáo về việc giảm khả năng phân giải của hemicellulose nhiều hơn khi có tanin (Barry và Manley, 1984; Waghorn và

cs., 1994a; Hervás và cs., 2003a). Cuối cùng, tanin có thể có ảnh hưởng trực tiếp đến hệ vi sinh vật dạ cỏ do làm thay đổi tính thẩm thấu qua màng tế bào (Leinmüller và cs., 1991; Scalbert, 1991). Tuy nhiên, một số vi sinh vật dạ cỏ có thể dung nạp tanin (Nelson và cs., 1998; O'Donovan và Brooker, 2001). Mức độ dung nạp là đặc trưng cho vi sinh vật trong câu hỏi, giải thích tính miễn cảm khác nhau của các chủng vi khuẩn. Nó cũng phụ thuộc vào tanin và sự khác biệt giữa HT và CT.

1.2.4. Hiệu quả tích cực của tanin

1.2.4.1. Thoát qua dạ cỏ

Tanin phức hợp protein trong môi trường pH của dạ cỏ và bảo vệ protein không bị các enzyme của vi sinh vật phân giải. Những phức hợp này không ổn định ở độ pH axit của dạ múi khế và được tiêu hóa ở đây (Barry và Manley, 1984); Jones và Mangan, (1977).

1.2.4.2. Tái tạo urê

Tanin có thể làm tăng hiệu quả tái tạo urê ở thành dạ cỏ. Tanin làm giảm tốc độ phân giải protein và khử amin trong dạ cỏ do đó hạ thấp N-NH_3 (Woodward, 1989). Nitơ urê huyết tương, N-NH_3 dạ cỏ và N mất đi trong nước tiểu thấp hơn khi cừu và dê được cho ăn các loại cây họ đậu có chứa tanin (Woodward, 1989). Tanin có thể làm tăng hàm lượng glycoprotein và bài tiết nước bọt, theo đó có nhiều N được tái tạo ở thành dạ cỏ (Robbins và cs., 1987).

1.2.4.3. Hiệu quả với vi sinh vật

Tanin làm tăng khả năng sản sinh vi sinh vật tính trên một đơn vị chất hữu cơ được tiêu hóa. Một số nhà nghiên cứu đã quan sát thấy lượng nitơ không phải từ amoniac (non-amonia nitrogen-NAN) đến tá tràng lớn hơn

lượng nitơ (N) của các loại cây họ đậu có chứa tanin. Do N không được tạo ra trong dạ cỏ, nên một phần của NAN tăng lên là từ các nguồn nội sinh được tích hợp vào vi sinh vật. Lượng nitơ ở tá tràng lớn hơn lượng N phổ biến đối với khẩu phần ít N ($< 1\%$), nhưng đối với các loại cây họ đậu có lượng N $> 2\%$ thì N ở tá tràng thường thấp hơn lượng N (Barry và Manley, 1984).

Hơn nữa, không có tác dụng của CT đối với lượng thức ăn ăn vào, thay đổi khối lượng và khả năng tiêu hóa khi bò thịt được ăn khẩu phần bổ sung vỏ măng cụt (*Garcinia mangostana*) có chứa tanin. Tuy nhiên, hiệu quả tổng hợp protein của vi sinh vật dạ cỏ và tỷ lệ protein/năng lượng (Protein/Energy – P/E) cao hơn một chút ở bò cho ăn vỏ măng cụt so với nhóm đối chứng.

1.2.4.4. Dinh dưỡng

Tác dụng có lợi của tanin trên cừu liên quan đến sự thoát qua và hấp thụ axit amin nhiều hơn, đặc biệt đối cừu được nuôi bằng thức ăn có chứa tỷ lệ tanin dao động từ 2-4% (Wang và cs., 1994, 1996b; Min và cs., 1999). Tăng tốc độ sinh trưởng, khả năng sản xuất và giá trị dinh dưỡng của sữa ở cừu có thể là do sự gia tăng các axit amin thiết yếu (Waghorn và cs., 1987; Wang và cs., 1994). Tăng lượng axit amin chứa lưu huỳnh là tiền chất chính để sản xuất len có thể góp phần tăng sản lượng len (Wang và cs., 1994; McNabb và cs., 1993). Tanin tạo phức hợp với các protein ngăn cản mức độ phân giải protein trong dạ cỏ, do đó làm tăng lượng protein đến ruột (Waghorn và cs., 1994; McNabb và cs., 1996). Hơn nữa, giá trị pH trong dạ cỏ (6.0-7.0) rất thuận lợi cho việc hình thành các phức chất ổn định giữa tanin và protein. Khi các phức hợp đi vào ruột có pH thấp hơn (2,5-3,5) sẽ phân tách liên kết giữa tanin và protein làm tăng cường tiêu hóa các axit amin thiết yếu trong ruột cừu (Waghorn và cs., 1994). Lượng protein lớn hơn này sẽ được hấp thụ trong ruột cừu. Ngược lại, nồng độ tanin cao làm giảm tỷ lệ tiêu

hóa protein dẫn đến giảm tốc độ sinh trưởng, sản xuất len, năng suất và chất lượng sữa (Waghorn và cs., 1994).

1.2.4.5. Kiểm soát ký sinh trùng

Các báo cáo gần đây về động vật nhai cho thấy rằng tanin chứa thức ăn làm giảm tác dụng bất lợi của ký sinh trùng đường tiêu hóa bằng cách tiêu diệt ấu trùng và giun trưởng thành (Athanasiadou và cs., 2000). Tương tự, các nhà khoa học khác nhau đã quan sát thấy số lượng trứng giun trong phân cừu thấp hơn thấy ở cừu ăn khẩu phần bổ sung các mức tanin cô đặc khác nhau (Niezen và cs., 1998; Paolini và cs., 2003a, 2005; Molan và cs., 1999, 2000, 2002; Waghorn và Molan, 2001). Tanin liên kết với các protein trong đường tiêu hóa và làm giảm chất dinh dưỡng sẵn có gây ra tình trạng đói cho ấu trùng và giun và dẫn đến chết (Athanasiadou và cs., 2001). Ngoài ra, tanin cũng sẽ liên kết với lớp biểu bì của ấu trùng chứa nhiều glycoprotein từ đó làm chết ấu trùng (Thompson và Geary, 1995).

1.2.4.6. Giảm hoạt động của enzyme Proteolytic và sự tăng trưởng của vi sinh vật dạ cỏ

Tanin cô đặc (CT) làm giảm đáng kể hoạt tính của enzyme phân giải protein và sự phát triển của vi khuẩn trong dạ cỏ cừu (Jones và cs., 1993). CT tạo thành phức hợp với các polyme bao bọc tế bào của vi khuẩn và các enzyme phân giải protein do chúng tiết ra, cho phép protein thoát qua dạ cỏ. Những phức hợp này sẽ giải phóng protein trong điều kiện axit của dạ múi khế. Các phân tử protein này được enzyme trong ruột non thủy phân theo đó làm tăng lượng axit amin được hấp thụ (Jones và Mangan, 1977; Martin và Martin, 1983; McNabb và cs., 1998).

1.2.5. Tác dụng của tanin trong chăn nuôi

Khi gia súc ăn khẩu phần chứa tanin có thể ảnh hưởng đến lượng thức ăn vào, khả năng tiêu hóa chúng và khả năng sản xuất. Nhìn chung, lượng tanin cao có ảnh hưởng tiêu cực rõ rệt đến năng suất; chất dinh dưỡng bị giảm do các phức hợp hình thành giữa tanin và một số đại phân tử, giảm lượng thức ăn ăn vào và khả năng tiêu hóa, sinh lý tiêu hóa của động vật có thể bị suy giảm và có thể ảnh hưởng đến niêm mạc, v.v. Barry (1985) quan sát thấy tăng khối lượng ở những con cừu được cho ăn cây *L. pedunculatus* (có hàm lượng tanin cô đặc cao; 76-90 g/kg vật chất) giảm đáng kể. Tuy nhiên, các nghiên cứu cho thấy tanin trong một số loại thức ăn thô xanh lại mang đến tác dụng có lợi khi sử dụng với lượng vừa phải (Aerts và cs., 1999; Barry và McNabb, 1999; Min và cs., 2003 ; Waghorn và McNabb, 2003). Việc tiêu thụ dưới 50 g tanin cô đặc (CT)/kg vật chất khô (10-40 g/kg DM) đã cải thiện hiệu quả sử dụng thức ăn ở gia súc nhai lại, chủ yếu là do giảm phân giải protein ở dạ cỏ và do đó chúng được cung cấp cho vật chủ nhiều hơn (chủ yếu là các axit amin cần thiết được hấp thụ ở ruột non (Schwab, 1995; Barry và McNabb, 1999; Min và cs., 2003). Wang và cs. (1994 và 1996a) cho thấy việc chăn thả của *L. corniculatus* (34 g CT/kg DM) làm giảm lượng thức ăn nhưng tăng khối lượng cơ thể, khối lượng thịt xẻ và tỷ lệ thịt xẻ, so với nhóm được bổ sung polyethylen glycol (PEG). Nghiên cứu của Montossi và cs. (1996) cừu chăn thả được bổ sung lá *Holcus lanatus* (4.2 g CT/kg DM) đã tăng 23% khối lượng so với đối chứng.

Đối với sản xuất sữa, Wang và cs. (1996b) đã báo cáo về việc tăng đáng kể hiệu quả sản xuất sữa, tăng hàm lượng protein, đường và giảm hàm lượng chất béo trong sữa. Hàm lượng protein tăng lên có thể được giải thích là do tăng các axit amin đường ruột, đặc biệt là methionine và lysine. Hàm lượng đường sữa lớn hơn có thể do glucose được cung cấp lớn hơn; hầu hết

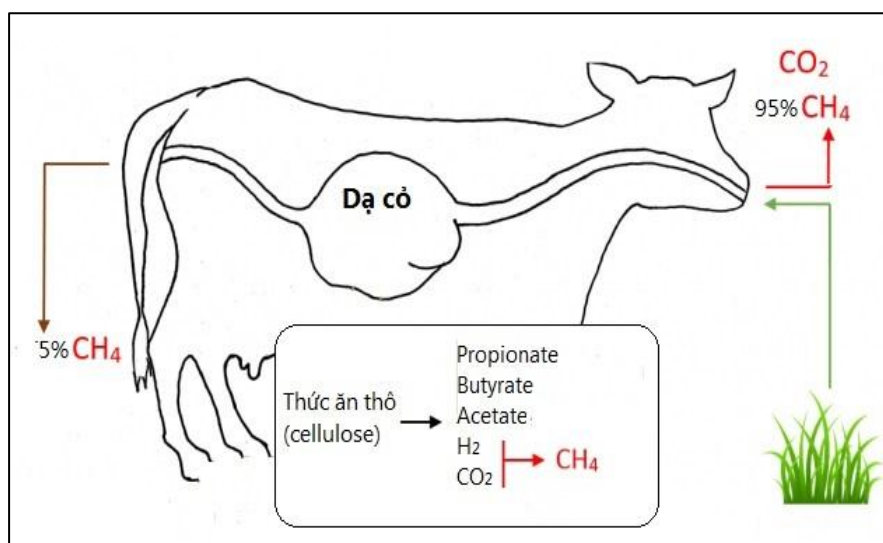
tổng hợp đường sữa trong tuyến vú phụ thuộc trực tiếp vào đường huyết và trong động vật nhai lại gluconeogenesis chủ yếu liên quan đến axit propionic và các axit amin. Do đó, nguồn các axit amin lớn hơn sẽ góp phần tổng hợp glucose nhiều hơn. Trong khi đó, việc giảm hàm lượng chất béo được cho là do hiệu ứng pha loãng khi nồng độ của đường sữa và protein tăng lên. Montossi và cs. (1996) cũng quan sát thấy rằng cừu chăn thả được bổ sung cây *H. lanatus*, với nồng độ CT thấp (4,2 g CT/kg DM), đã tăng sản lượng len lên 10%.

1.3. QUÁ TRÌNH SẢN SINH KHÍ MÊTAN TRONG DẠ CỎ

Đặc điểm nổi bật của bộ máy tiêu hoá ở gia súc nhai lại là những khoang phình lớn, tại đây có các điều kiện môi trường thuận lợi cho vi sinh vật lên men carbohydrate và các chất hữu cơ khác. Sản phẩm chủ yếu của quá trình lên men tại đây là các axit béo bay hơi (ABBH), khí mêtan (CH_4), khí cacbonic (CO_2) và adenosin triphosphat (ATP) - chất mang năng lượng cần thiết cho sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật.

Trong quá trình lên men dạ cỏ, ngoài các sản phẩm chính là các axit béo bay hơi (như axetic, propionic và butyric) ra thì một sản phẩm không mong muốn đó là khí mêtan (CH_4). Quá trình lên men thức ăn cùng sự sản sinh khí mêtan được biểu thị bằng các phương trình phản ứng và minh họa qua hình dưới đây:

- Axit axetic: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$
- Axit propionic: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$
- Axit butyric: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$
- Khí mêtan: $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$



Trong điều kiện yếm khí ở dạ cỏ: Phản ứng oxy hóa để lấy năng lượng ở dạng ATP giải phóng ra hydro (H). Tích lũy ion hydro trong quá trình trao đổi chất của vi sinh vật dạ cỏ chỉ có thể tránh được bằng quá trình sinh tổng hợp CH_4 bởi những vi khuẩn sinh mêtan (rumen methanogens) (O'Mara và cs., 2008). Đây là qui trình bình thường trong quá trình lên men ở dạ cỏ. Lượng hydro giải phóng phụ thuộc chủ yếu vào khẩu phần và loại hình vi sinh vật dạ cỏ vì lên men vi sinh vật thức ăn tạo ra các sản phẩm cuối cùng khác nhau và không tương đương với lượng hydro tạo ra (Martin và cs., 2008). Ví dụ, để tạo ra axit propionic thì tiêu thụ hydro trong khi đó để tạo ra axit acetic và axit butyric lại giải phóng hydro (Martin và cs., 2008).

Quá trình sinh CH_4 ở dạ cỏ là cơ chế tạo điều kiện cho dạ cỏ tránh được nguy cơ tích lũy quá nhiều hydro (Martin và cs., 2008). Hydro tự do sẽ ức chế enzym khử hydro (dehydrogenases) và ảnh hưởng đến quá trình lên men (Martin và cs., 2008). Sử dụng H và CO_2 để tạo ra CH_4 là một đặc tính đặc biệt của nhóm vi khuẩn sinh CH_4 . Nhóm vi khuẩn này tương tác với các nhóm vi sinh vật khác trong dạ cỏ để tăng hiệu quả sử dụng năng lượng và kéo dài việc tiêu hóa thức ăn (Martin và cs., 2008). Tương tác này là tích cực đối với

nhóm vi sinh vật phân giải xơ (*Ruminococcus albus* và *R. flavefaciens*), không phân giải xơ (*Selenomonas ruminantium*), protozoa và nấm (McAllister và cs., 1996).

Ở gia súc nhai lại, mêtan được sản sinh trong dạ cỏ bởi nhóm vi khuẩn sinh khí mêtan sử dụng các sản phẩm chuyển hóa của các loài vi khuẩn khác, protozoa, nấm trong quá trình phân giải thức ăn. Nhóm vi khuẩn này sử dụng H_2 và CO_2 là cơ chất chính để tạo khí mêtan như sản phẩm cuối cùng của chu trình trao đổi năng lượng và sống kỵ khí bắt buộc (Wolin và cs., 1997). Trong dạ cỏ, các vi khuẩn sinh khí mêtan phải sống cộng sinh với protozoa và các loài vi sinh vật khác. Mêtan được tạo thành từ CO_2 và H_2 dưới tác dụng của vi khuẩn methanogenic cùng với năng lượng của cơ thể động vật. Methanogenic là nhóm vi khuẩn trong hệ vi sinh vật dạ cỏ của động vật nhai lại, chúng có thể tồn tại ở pH trung tính 6-8, tuy nhiên, một số loài methanogenic có thể tồn tại trong môi trường pH dao động từ 3-9,2 (Jones và cs., 1987). Hiện nay, người ta đã tìm thấy 5 loài vi khuẩn methanogenic trong dạ cỏ của động vật nhai lại là *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium formicicum* và *Methanomicrobium mobile* trong đó 2 loài đầu là phổ biến nhất. Vi khuẩn methanogenic có thể sống tự do trong dạ cỏ hoặc chúng sống cộng sinh trên bề mặt của protozoa.

Hầu hết khí CH_4 thải ra trong chăn nuôi là từ gia súc nhai lại thông qua quá trình lên men yếm khí ở dạ cỏ. Tuy nhiên, sự sản sinh mêtan cũng xảy ra các phần dưới của đường tiêu hóa như ruột già. Khoảng 89% mêtan được sản sinh ra từ dạ cỏ và được thải ra ngoài thông qua miệng và mũi (Murray và cs., 1976). Khi mêtan thải ra ngoài môi trường thì gia súc nhai lại mất đi 2-12% năng lượng thô từ thức ăn ăn vào, tùy thuộc vào loại khẩu phần. Ở các loài gia súc nhai lại khác nhau thì tỷ lệ mất năng lượng thô do sự sản sinh mêtan cũng rất khác nhau. Theo Johnson và Ward (1996) thì tỷ lệ năng lượng thô mất đi

do thải mêtan của bò sữa và bò thịt vỗ béo thay đổi lần lượt từ 5,5 – 9,0% và 3,5 – 6,5%. Ở trâu và lạc đà dao động trong khoảng 7,5 – 9,0% và 7,0 – 9,0%. Tỷ lệ mất năng lượng thô do thải mêtan của động vật nhai lại cũng thay đổi theo vị trí địa lý, chất lượng thức ăn, lượng thức ăn ăn vào, thành phần thức ăn và quá trình chế biến thức ăn (Johnson và Ward, 1996). Hơn 50% số lượng gia súc nhai lại của toàn thế giới tập trung ở vùng nhiệt đới và chúng được nuôi chủ yếu bằng các khẩu phần có chất lượng thấp, khi đó 10-12% năng lượng thô của thức ăn sẽ bị mất đi do mêtan (McCrabb và Hunter, 1999).

1.4. MỘT SỐ GIẢI PHÁP GIẢM PHÁT THẢI KHÍ NHÀ KÍNH Ở GIA SÚC NHAI LẠI

1.4.1. Một số giải pháp chung giảm thiểu phát thải khí nhà kính

Để giảm phát thải khí nhà kính từ chăn nuôi gia súc nhai lại, theo Hristov và cs. (2013) có các giải pháp sau đây:

- (i) Giải pháp về dinh dưỡng;
- (ii) Giải pháp về quản lý;
- (iii) Giải pháp về di truyền giống;
- (iv) Giải pháp về công nghệ sinh học;
- (v) Giải pháp về quản lý và sử dụng chất thải;
- (vi) Các giải pháp khác như: Quản lý đồng cỏ nhằm giảm thiểu phát thải khí nhà kính từ đồng cỏ.

Giảm thiểu thải khí mêtan từ gia súc nhai lại đạt được hai mục đích đó là (i) giảm khí nhà kính toàn cầu và (ii) nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn. Có nhiều cách để giảm thải khí mêtan từ gia súc nhai lại thông qua thay đổi con đường trao đổi chất và thay đổi tổ hợp vi sinh vật dạ cỏ hay tác động để thay đổi sinh lý tiêu hóa dạ cỏ. Hai yếu tố trong con đường trao đổi chất cần quan tâm để phát triển chiến lược giảm thiểu CH_4 ở gia súc nhai lại đó là (i) giảm sinh hydro (H) nhưng không được ảnh hưởng đến lên men thức ăn trong

dạ cỏ và (ii) giảm thiểu CH_4 phải đi liền với con đường trao đổi chất tiêu thụ hydro (H) để tránh hiệu quả tiêu cực khi có quá nhiều H trong dạ cỏ. Chiến lược giảm CH_4 ở dạ cỏ vì thế là tìm cách giảm tạo ra hydro (H), ngăn chặn và hạn chế quá trình hình thành CH_4 , đưa hydro (H) vào các sản phẩm trao đổi chất khác hoặc tạo ra các bể chứa hydro khác. Chiến lược dinh dưỡng giảm thiểu CH_4 là dựa trên cơ sở các nguyên lý này.

1.4.2. Một số giải pháp dinh dưỡng giảm thiểu phát thải khí nhà kính

Theo Hristov và cs. (2013), giải pháp dinh dưỡng bao gồm:

- Thay đổi chất lượng khẩu phần: Thay thế thức ăn thô bằng thức ăn tinh, lựa chọn loại carbohydrate để nâng cao tỷ lệ tiêu hóa của khẩu phần, nâng cao chất lượng và chọn loại thức ăn ủ chua thích hợp.
- Bổ sung thức ăn gồm: (i) Bổ sung các chất ức chế (inhibitors) vào khẩu phần; (ii) Bổ sung các chất nhận electron (electron receptors); (iii) Bổ sung lipid vào khẩu phần; (iv) Sử dụng axit hữu cơ; (v) Sử dụng các hợp chất thứ cấp và chất tách chiết từ thực vật; (vi) Bổ sung enzyme ngoại sinh (Exogenous enzymes); (vii) Bổ sung cơ chất trực tiếp cho vi sinh vật (Direct-fed microbials); (viii) Sử dụng kháng sinh; (ix) Sử dụng probiotics.
- Loại bỏ Protozoa
- Quản lý nuôi dưỡng: Chế biến thức ăn, khẩu phần thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), tần suất cho ăn.

1.4.2.1. Bổ sung các chất ức chế - Inhibitors

Rất nhiều chất ức chế đến hệ vi sinh vật dạ cỏ đã được nghiên cứu. Trong số này bromochloro mêtan (BCM), 2-bromo-ethane sulfonate (BES), chloroform và cyclodextrin là những hợp chất đã được thử nghiệm thành công nhiều nhất trong điều kiện *in vivo*. Các chất ức chế sản sinh mêtan này đã giảm một cách đáng tin cậy về thống kê trên 50% CH_4 ở bò và cừu BCM/BES

(Mitsumori và cs., 2011 và Immig và cs., 1996); chloroform (Knight và cs., 2011); cyclodextrin (Lila và cs., 2004).

Nhiều nghiên cứu gần đây cũng cho rằng BCM có thể là một chất ức chế CH_4 *in vivo*. Trong một loạt thí nghiệm trên bò đực thuần lai Brahman, Tomkins và cs. (2009) đã quan sát thấy lượng CH_4 sản xuất ra trong dạ cỏ đã giảm tới 93% khi cho ăn BCM ở mức 0,3 g/100 kg khối lượng cơ thể. Trong một thí nghiệm tiếp theo với liều BCM như trên đã làm giảm CH_4 sinh ra trong dạ cỏ đến 50% trong một thí nghiệm kéo dài 90 ngày. Không thấy BCM ảnh hưởng đến tăng trọng, lượng thức ăn ăn vào, hiệu quả sử dụng thức ăn và chất lượng thịt xẻ, đồng thời cũng không thấy tồn dư BCM tăng lên trong mô. Mặc dù BCM đã bị cấm sử dụng từ 2002 vì làm thủng tầng ozôn, các tác giả cho rằng các kết quả này gợi ý cho các hướng nghiên cứu sử dụng các hợp chất hóa học khác có cách hoạt động tương tự như BCM.

Một nghiên cứu khác gần đây trên dê khi cho ăn 0,3g BCM/100 kg khối lượng cơ thể trong 10 tuần (Abecia và cs., 2012) cho thấy mêtan tạo ra ở dạ cỏ tính trên mỗi đơn vị chất khô ăn vào đã giảm 33% và tỷ lệ axit propionic trong dạ cỏ đạt đến gần 40%. Các tác giả này cũng thấy năng suất sữa của dê tăng 36% mặc dù không có sự sai khác về chất khô ăn vào. Trong khi một số nghiên cứu khác cho rằng hệ sinh thái dạ cỏ cần phải có sự thích ứng với nhóm chất này (Johnson và cs., 1972 và Immig và cs., 1996), ảnh hưởng của BCM có vẻ khá bền vững và chắc chắn trong các nghiên cứu của Sawyer và cs. (1974), Tomkins và cs. (2009), và Abecia và cs. (2012).

Các chất ức chế CH_4 đặc biệt là BCM và chloroform là các chất ức chế CH_4 rất hiệu quả. Vì đã bị cấm nên BCM và các hợp chất tương tự không thể dùng để giảm phát thải CH_4 . Tuy nhiên các hợp chất với cách hoạt động tương tự có thể cần được nghiên cứu. Ảnh hưởng lâu dài của các chất ức chế

CH₄ còn chưa chắc chắn và cần có nhiều số liệu hơn nữa để xem xét ảnh hưởng lâu dài. Ngoài ra sự chấp nhận của cộng đồng (do nhận thức hoặc các luật lệ đang có hoặc sẽ có vì nhóm chất này được biết đến là các chất gây ung thư – carcinogens - chloroform) có thể là cản trở cho việc áp dụng. Mặc dù vậy các nhóm nghiên cứu trên thế giới vẫn đang phát triển các hợp chất tự nhiên hay tổng hợp để ức chế sản sinh CH₄ trực tiếp trong một tương lai gần.

1.4.2.2. *Bổ sung các chất nhận electron - electron receptors*

Loại nhóm chất nhận electron này gần đây được xem xét lại với nhiều quan tâm. Trong nhóm này, fumarate, nitrates, sulphates và nitroethane (Gutierrez-Banuelos và cs., 2007; Brown và cs., 2011) được nghiên cứu nhiều nhất. Leng (2008) là người đã tổng quan lại các nghiên cứu trước đây về nitrates. Gần đây nghiên cứu trên cừ (Sar và cs., 2004; Nolan và cs., 2010; van Zijderveld và cs., 2010) và trên bò (van Zijderveld và cs., 2011a,b; Hulshof và cs., 2012) đã cho các kết quả rất khả quan với nitrates: giảm sản sinh mêtan dạ cỏ đến 50%.

Các vấn đề liên quan đến nhóm chất này bao gồm đáp ứng của hệ sinh thái dạ cỏ, trừ trường hợp nitrate được báo cáo luôn luôn làm giảm tạo ra CH₄ ở bò sữa trong suốt 20 ngày liên tục (van Zijderveld và cs., 2011b), còn chưa được nghiên cứu dài hơi trong các thí nghiệm trên động vật. Một vấn đề nữa liên quan đến nitrate là tiềm năng làm tăng NH₃ gây ra do sản phẩm chuyển hóa trung gian (nitrite). Vấn đề độ độc của nitrate đã được Leng (2008) tổng quan rất chi tiết và kết luận rằng chuyển hóa nitrite từ nitrate trong dạ cỏ có thể được hạn chế khi quản lý cho ăn tốt.

Trong tổng quan của Leng (2008) cũng nhấn mạnh tầm quan trọng đặc biệt trong việc đáp ứng từ từ của gia súc với nitrate và các khẩu phần protein thấp là cơ sở tự nhiên quan trọng để sử dụng thành công nitrate như là một

công cụ giảm thiểu phát thải CH_4 . Rõ ràng, hệ sinh thái dạ cỏ phải thích ứng với nitrate trong khẩu phần và tạo ra khả năng giảm quá nhanh để chuyển hóa nitrate thành NH_3 . Bằng chứng là có sự tăng đáng kể và từ hoạt động của vi sinh vật khử nitrate, khi đưa nitrate vào khẩu phần cùng với sự có mặt của các nhóm vi khuẩn đặc thù trong các gia súc đã thích ứng với nitrate (Allison và Reddy, 1984).

Khối tăng liềm urê rỉ mật đa dinh dưỡng được thiết kế để cung cấp urê, hỗn hợp các chất khoáng và trong một vài trường hợp là protein phân giải chậm đối với gia súc nhai lại trong điều kiện chăn thả (Sansoucy và cs., 1988). Nếu nitrate thay thế urê trong các khối tăng liềm urê rỉ mật đa dinh dưỡng này thì việc tiếp cận chúng cần phải hạn chế để lượng nitrate ăn vào không làm gia súc ngộ độc. Lượng ăn vào của các thức ăn bổ sung thông qua khối tăng liềm hoặc bổ sung ở dạng lỏng có thể rất biến động, vì thế khả năng ngộ độc là hoàn toàn có thể xảy ra nếu có nitrate bổ sung.

Điều quan trọng cần biết là đáp ứng của hệ sinh thái dạ cỏ để khử nitrate có thể rất ngắn ngay sau khi loại bỏ nitrate trong khẩu phần. Alaboudi và Jones (1985) báo cáo rằng hoạt động khử nitrate của dịch dạ cỏ cừu đã quen với nitrate ở mức 2,5 g/kg khối lượng/ngày đã giảm về mức khởi đầu trong 3 tuần sau khi không bổ sung KNO_3 trong khẩu phần. Đây là vấn đề an toàn vô cùng quan trọng và nó chính là yếu tố cản trở việc sử dụng nitrate ở các nước đang phát triển để giảm phát thải khí nhà kính (mêtan) trong các hộ chăn nuôi nhỏ lẻ, do sự sẵn có của thức ăn và khẩu phần thay đổi liên tục. Mức nitrate trong khẩu phần cơ sở cũng phải được xem xét khi bổ sung.

Hình như việc tạo N_2O trong đường tiêu hóa gần như bằng không. Các nghiên cứu trước đây báo cáo rằng, chỉ có một lượng cực nhỏ (trace) N_2O được tạo ra trong dạ cỏ do quá trình khử nitrate (Kaspar và Tiedje, 1981). Các

tác giả này báo cáo là có đến 0,3% nitơ thêm vào được tích lũy dưới dạng N_2O và không tiếp tục bị khử. Trên cơ sở các kết quả này, trong điều kiện *in vitro*, các tác giả đã kết luận rằng N_2O dạ cỏ là phụ phẩm của quá trình dị hóa khử nitrit thành ammonia và không phải là quá trình khử nitơ – quá trình này không tồn tại trong dạ cỏ. Nồng độ N_2O trong dạ cỏ bò đang cho sữa thấp hơn vào khoảng 103 lần nồng độ CH_4 (Hristov và cs., 2010b; 2011b).

Đưa thêm sulphate vào khẩu phần của cừu đã làm giảm sản xuất CH_4 ở dạ cỏ và khi bổ sung cả nitrate và sulphate thì ảnh hưởng của chúng đến giảm thiểu CH_4 ở dạ cỏ là cộng gộp (van Zijderveld và cs., 2010). Ảnh hưởng của sulphat bổ sung đến sức khỏe gia súc cũng chưa được rõ ràng.

Tiềm năng của các chất nhận electron, đặc biệt là nitrate cần được tiếp tục khai thác đặc biệt đối với các khẩu phần nghèo protein, ở đây vi sinh vật dạ cỏ có thể có được các lợi ích từ các nguồn nitơ phi protein (non-protein N - NPN) sau một thời gian đáp ứng. Chiến lược bổ sung nitrate có thể đặc biệt hấp dẫn ở các nước đang phát triển, nơi mà trong cỏ không có nitrate và không đủ protein thô (CP) để duy trì khả năng sản xuất của gia súc. Cần chú ý rằng, tổng hợp của vi sinh vật dạ cỏ sẽ tăng khi có mặt peptide (Russell và cs., 1992) và số lượng NPN quá nhiều trong khẩu phần có thể có ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất gia súc. Tổng nitơ khẩu phần cơ sở thấp có thể là điều kiện quan trọng cho sử dụng nitrate thành công trong việc làm giảm phát thải CH_4 ở dạ cỏ mà không làm tăng phát thải N_2O từ đất do sử dụng phân bón hay tăng hình thành N_2O do khẩu phần nhiều protein thô (CP). Nitơ từ nitrate bổ sung sẽ mất mát một chút ít trong nước tiểu (Takahashi và cs., 1998), nhưng ảnh hưởng của bổ sung nitrate đến tổng nitơ mất đi trong nước tiểu vẫn chưa rõ.

A xít Fumaric ($C_4H_4O_4$) và Malic ($C_4H_6O_5$) cũng đã được nghiên cứu rất nhiều như là một bể chứa hydro (H) trong dạ cỏ. Tiềm năng giảm phát thải của chúng vẫn còn là câu hỏi (Ungerfeld và cs., 2007) vì tiềm năng này thấp hơn nitrate và kết quả thường không nhất quán.

Wood và cs. (2009) cho thấy có ảnh hưởng của a xít fumaric đến phát thải CH_4 . Ảnh hưởng lâu dài của a xít fumaric đến phát thải CH_4 chưa có cơ sở vững chắc trong hàng loạt các thí nghiệm trong các điều kiện nuôi dưỡng khác nhau (McCourt và cs., 2008). Là một a xít hữu cơ, các muối fumarate và malate được coi là an toàn dùng để bổ sung vào thức ăn.

Có thể nói về tổng thể, nitrate là tác nhân giảm phát thải CH_4 từ dạ cỏ đầy hứa hẹn, đặc biệt với các khẩu phần nghèo nitơ, có thể cần bổ sung nitơ phi protein. Điều cực kỳ quan trọng là, gia súc cần phải đáp ứng tốt để tránh ngộ độc khi sử dụng nitrate. Cần có nhiều các nghiên cứu *in vivo* để có thể hiểu biết đầy đủ ảnh hưởng của bổ sung nitrate đến phát thải khí nhà kính (GHG – green house gases) ở toàn trang trại (gia súc, dự trữ phân và sử dụng phân cho trồng trọt), cũng như năng suất và sức khỏe gia súc. A xít fumaric và malic có thể giảm sản xuất CH_4 ở dạ cỏ khi sử dụng với số lượng lớn, tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu không cho thấy chúng ảnh hưởng đến phát thải CH_4 . Các nghiên cứu dài hơn vẫn chưa khẳng định các ảnh hưởng này và giá cả có thể là nguyên nhân làm cho việc ứng dụng các a xít này không khả thi.

1.4.2.3. Bổ sung các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật (Plant bioactive compounds - PBAC)

Loại các hợp chất này bao gồm một loạt các hợp chất thứ cấp có trong thực vật đặc biệt là tanin, saponin và tinh dầu cùng các thành phần hoạt hóa của chúng.

Tanin và saponin đã được nghiên cứu khá nhiều và đã chứng tỏ là các hợp chất có nhiều hứa hẹn nhất cho việc giảm phát thải CH_4 từ dạ cỏ. Tanin là thức ăn bổ sung hoặc là các cây cỏ có nhiều tanin thường, nhưng không phải là luôn luôn có ảnh hưởng tích cực đến giảm phát thải CH_4 dạ cỏ đến trên 20% (Beauchemin và cs., 2007a). Tanin cô đặc và tanin thủy phân (CT và HT) phân bố rộng rãi trong cỏ và cây các vùng khí hậu nóng và thường được xem như là các yếu tố kháng dinh dưỡng, mặc dù chúng có thể làm giảm số lượng giun sán và có được mức năng suất chấp nhận được khi có mặt của ký sinh trùng trong cơ thể gia súc (Niezen và cs., 1995, 1998a, b; Terrill và cs., 1992).

Tanin sẽ chắc chắn là yếu tố kháng dinh dưỡng khi protein thô khẩu phần là yếu tố hạn chế năng suất bởi vì chúng giảm hấp thu axit amin ở ruột (Waghorn, 2008). Cấu trúc, phân tử lượng và hàm lượng tanin cô đặc có ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng của khẩu phần và điều quan trọng là việc giảm mêtan từ dạ cỏ do tanin không ảnh hưởng quá xấu đến tiêu hóa và năng suất gia súc.

Đã có nghiên cứu rất rộng hơn về các hợp chất chứa nhiều nhóm phenolic - polyphenolic compounds, đặc biệt là tanin cô đặc có trong cỏ ôn đới (trong khuôn khổ dự án cỏ khô cho sức khỏe do liên hiệp châu Âu tài trợ - European Union-supported “Healthy hay”). Nhưng năng suất của cây cỏ họ đậu có chứa tanin ở nhiệt đới và ôn đới thường thấp hơn các loại cỏ khác. Tuy vậy, các lợi ích về dinh dưỡng và sức khỏe gia súc (tẩy giun sán và chống chướng hơi dạ cỏ - anthelmintic, bloat safe) của tanin đi cùng với giảm sinh mêtan và đặc biệt giảm phát thải N_2O , và việc không cần N cho các cây họ đậu này rất hấp dẫn cho phát triển chăn nuôi gia súc nhai lại bền vững với môi trường.

Giảm tỷ lệ tiêu hóa của các khẩu phần có tanin cô đặc đã được ghi nhận ở hầu hết các báo cáo (Waghorn, 2008; Patra, 2010) và là việc không thể tránh khỏi nếu nitơ mất đi trong nước tiểu giảm do nitơ chuyển nhiều sang phân (giảm tỷ lệ tiêu hóa protein và chất hữu cơ). Đây là một yếu tố quan trọng cần xem xét khi bổ sung tanin hoặc các cây cỏ giàu tanin vào khẩu phần, tuy vậy quan hệ giữa tiêu hóa và tanin lại chịu ảnh hưởng của loại tanin và thành phần khẩu phần (Waghorn, 2008). Hơn nữa phần carbon (C) của tanin cô đặc được bài tiết trong phân (Terrill và cs., 1994), vì thế hàm lượng tanin không tiêu hóa có trong khẩu phần sẽ làm hạn chế chất hữu cơ có thể được gia súc sử dụng.

Đã có đủ các bằng chứng thấy rằng, tanin làm giảm tỷ lệ tiêu hóa của thức ăn ủ chua (Albrecht và Muck, 1991; Broderick và Albrecht, 1997; Tabacco và cs., 2006; Colombini và cs., 2009), nhưng không rõ sự giảm này có thể đo đếm được ảnh hưởng đến sử dụng protein khẩu phần và năng suất của gia súc hay không. Trong một vài trường hợp, năng suất của gia súc đã tăng lên khi đưa vào khẩu phần một lượng lớn các cây cỏ có chứa tanin, mặc dù nitơ tiêu hóa ở toàn bộ đường tiêu hóa giảm. Thêm 60% cỏ birdsfoot trefoil ủ chua (*Lotus corniculatus*) có chứa 8 đến 16 g tanin cô đặc/kg chất khô vào khẩu phần bò sữa đang vắt sữa đã tăng năng suất sữa (khoảng 3 đến 4,5 kg/ngày so với nhóm đối chứng chỉ ăn cỏ alfalfa silage ủ chua), mặc dù chất khô ăn vào (DMI – Dry matter intake) là tương tự nhau và tỷ lệ tiêu hóa xơ thô (CFD – Crude Fiber Digestibility) và tỷ lệ tiêu hóa protein thô (CPD – Crude Protein Digestibility) ở nhóm bổ sung giảm (Hymes-Fecht và cs., 2013). Các tác giả cho rằng, sử dụng protein tốt hơn với birdsfoot trefoil ủ chua, nhưng khẩu phần Alfalfa ủ chua có hàm lượng CP cao hơn và protein khẩu phần không phải là yếu tố hạn chế trong nghiên cứu này vì khẩu phần cả hai có chứa 17% CP.

Các cây cỏ chứa tanin có thể có ảnh hưởng có lợi đến chất lượng cỏ ủ chua và sức khỏe, năng suất gia súc (cải thiện cung cấp protein, giảm chướng hơi và chống ký sinh trùng) (Broderick, 1995; McMahon và cs., 2000; Frutos và cs., 2004). Một đặc điểm của các nghiên cứu về ảnh hưởng của tanin đến tiêu hóa và năng suất của gia súc là các đáp ứng với tanin khá biến động. Một số biến động được giải thích là do loại hình, nồng độ tanin, khả năng bao bọc protein của tanin và hàm lượng protein của khẩu phần (Jayanegara và cs., 2009); các trường hợp khác như tính không ổn định về đáp ứng của gia súc với tanin có thể do kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu hàm lượng tanin (Makkar, 2003) và không tách được tanin cô đặc và tanin thủy phân (Mueller-Harvey, 2006) cũng như không xác định được lượng thức ăn ăn vào mong đợi hay nhu cầu dinh dưỡng tối ưu cho sản xuất. Tanin cô đặc có thể làm giảm tỷ lệ tiêu hóa (Makkar và cs., 1995), nhưng chúng có ảnh hưởng rất nhỏ đến gia súc được cho ăn ở mức duy trì vì dạ cỏ còn có thể chứa được nhiều thức ăn hơn nữa, tuy nhiên, ở bò đang vắt sữa, năng suất có thể giảm vì lượng ăn vào không đủ (Grainger và cs., 2009a).

Trong một tổng quan gần đây về ảnh hưởng của saponin và tanin đến sản xuất CH_4 ở gia súc nhai lại từ chủ yếu là các nghiên cứu *in vivo* (Goel và Makkar, 2012), các tác giả thấy rằng, nguy cơ làm rối loạn chức năng của dạ cỏ, giảm năng suất gia súc và giảm sản xuất CH_4 ở dạ cỏ của tanin cao hơn saponin. Đồng thời phạm vi nồng độ có thể sử dụng của tanin cũng hẹp hơn saponin. Trong một số tình huống dinh dưỡng, giảm phân giải protein ở dạ cỏ kết hợp với chuyển tiêu hóa protein xuống ruột non có thể lại có lợi nếu nguồn cung protein tiêu hóa không phân giải ở dạ cỏ giảm (Ruminally-Undegradable Protein - RUP). Việc chuyển vị trí tiêu hóa protein xuống ruột non có thể cũng có lợi là giảm nitơ mất đi qua nước tiểu và tăng nitơ thải ra trong phân.

Theo Goel và Makkar (2012), tác động chống ký sinh trùng của tanin phụ thuộc vào liều lượng tanin và số lượng các nhóm hydroxyl (nhóm ưa nước) trong cấu trúc của tanin. Về tổng quát, các tác giả này cho rằng hydrolyzable tanin (tanin tự do – tanin ưa nước) có khuynh hướng hoạt động trực tiếp ức chế vi sinh vật sinh methan ở dạ cỏ (rumen methanogens), trong khi ảnh hưởng của tanin cô đặc đến sản xuất CH_4 ở dạ cỏ lại chủ yếu thông qua ức chế tiêu hóa xơ. Hai tác giả cũng chỉ ra rằng, cần có thêm nhiều các nghiên cứu về tanin và saponin để xem xét ảnh hưởng ức chế vi sinh vật sinh metan ở dạ cỏ của chúng. Phương pháp xác định hydrolyzable tanins hiện đã có (Makkar, 2003), cần chú ý rằng hydrolyzable tanin bị thủy phân ở dạ cỏ và một số hydrolyzable tanins có thể là độc tố (Lowry và cs., 1996; McSweeney và cs., 2003).

Cũng như với các chất làm giảm phát thải CH_4 khác, ảnh hưởng lâu dài của tanin và saponin còn chưa được nghiên cứu nhiều. Thêm nữa, theo Goel và Makkar (2012), việc giảm phát thải CH_4 của các hợp chất này, đặc biệt là tanin có thể khó tránh khỏi việc giảm năng suất ở gia súc. Nghiên cứu của Grainger và cs. (2009a) là một ví dụ tốt để biết được bằng cách nào mà tỷ lệ tiêu hóa, lượng thức ăn ăn vào và đặc biệt là năng suất gia súc (kể cả năng suất mỡ và protein sữa) bị ảnh hưởng tiêu cực của tanin (trong trường hợp này là tanin cô đặc) khi chúng được dùng với liều quá cao.

Một nghiên cứu với dê cho ăn khẩu phần chứa 5,6g tanin/kg DM (tanin thủy phân và đậm đặc) cho thấy, tanin đã làm giảm hệ số phát thải từ 7,9 (nhóm đối chứng không có tanin) xuống còn 6,0% tổng năng lượng thô ăn vào (GEI – Gross Energy Intake) ở nhóm ăn tanin, nhưng khả năng tiêu hóa chất hữu cơ (OMD) đã giảm 10 đơn vị % và khả năng tiêu hóa protein (CPD) giảm 14 đơn vị % (Bhatta và cs., 2012); CPD cũng giảm ngay cả khi khẩu phần có ít tanin hơn (2,8 g/kg vật chất khô). Ảnh hưởng của tanin là có điều

kiện, chúng phụ thuộc vào thành phần của tanin (Waghorn, 2008; Goel và Makkar, 2012). Theo Pellikaan và cs. (2011b), *in vitro* gas và CH₄ sản xuất ra phụ thuộc vào đặc tính của tanin như loại hình (tanin cô đặc, hay ellagitanins hay gallotanins), độ hòa tan và tốc độ của phản ứng browning. Trong thí nghiệm của Pellikaan và cs. (2011b), valonea và myrobalan tanins có hiệu quả nhất trong giảm sản sinh CH₄ và có ảnh hưởng nhỏ nhất đến tổng lượng khí sinh ra.

Nghiên cứu về saponin được Goel và Makkar (2012) tổng hợp, có 6 nghiên cứu báo cáo việc giảm CH₄, từ 6 đến 27 % (theo tổng CH₄ hay CH₄ cho một đơn vị khối lượng hoặc một đơn vị thức ăn ăn vào). Ba trong số các nghiên cứu này OMD đã giảm và trong ba nghiên cứu khác, tỷ lệ tiêu hóa không được báo cáo. Từ phân tích các nghiên cứu này cho thấy dường như không có sự sai khác về hiệu quả giảm phát thải CH₄ giữa các loại saponin khác nhau: steroidal saponins (*Yucca schidigera*) và triterpenoid saponins (*Quillaja saponaria*); *Y. schidigera* và *Q. saponaria*, đây là các loại saponin được nghiên cứu nhiều nhất vì các chế phẩm có sẵn trên thị trường.

Các nghiên cứu từ Trung Quốc đã tập trung xem xét ảnh hưởng của saponin trong lá chè đến hiệu quả giảm phát thải CH₄ ở dạ cỏ và năng suất gia súc của Wang và cs. (2009); Hu và cs. (2005) trên cho dê ăn 0; 3 và 6g saponin từ lá chè/ngày đã quan sát thấy, dê tăng lượng thức ăn ăn vào và kết quả là tăng tăng trọng ngày (Average Daily Gain – ADG) khi cho ăn 3g saponin từ lá chè/ngày. Wang và cs. (2009) báo cáo là CH₄ ở dạ cỏ đã giảm gần 15% ở cừu cho ăn 70 mg chất tách chiết từ cây *Y. schidigera*/ngày. Mao và cs (2010) lại không thấy, ảnh hưởng của saponin từ lá chè (3g/ngày) đến ADG ở cừu nhưng là giảm sản xuất CH₄ ở dạ cỏ 28 %. Trong một nghiên cứu khác, Zhou và cs (2011a) báo cáo là saponin từ lá chè đã làm giảm sản xuất CH₄ ở dạ cỏ từ 6 đến 10% ở cừu cho ăn hạn chế. Một nhóm nghiên cứu khác, Sliwinski và cs. (2002)

báo cáo không có ảnh hưởng của saponin (*Y. schidigera* extract) ở mức 2 và 30 mg/kg chất khô khẩu phần đến sản xuất CH_4 ở dạ cỏ cừu. *Yucca schidigera* hoặc *Q. saponaria* cho bò sữa ăn ở mức 10 g/ngày cũng không ảnh hưởng đến năng suất sữa, tỷ lệ tiêu hóa toàn bộ đường tiêu hóa, lên men dạ cỏ và sản xuất CH_4 dạ cỏ bò (Holtshausen và cs. 2009). Tương tự, 3 g bột *Yucca*/kg chất khô khẩu phần ở bò sữa đã không ảnh hưởng đến lượng thức ăn ăn vào, năng suất sữa, thành phần sữa, tỷ lệ tiêu hóa, cân bằng năng lượng và sản xuất CH_4 ở dạ cỏ trong nghiên cứu của Van Zijderveld và cs. (2011c). Về tổng thể, với một vài ngoại lệ cho saponin từ lá chè, kết quả về saponin cần được khẳng định lại bằng các nghiên cứu khác, hiện vẫn chưa đủ bằng chứng về ảnh hưởng của saponin đến giảm phát thải CH_4 ở dạ cỏ hay ảnh hưởng của saponin đến năng suất gia súc.

Đã có hàng loạt các nghiên cứu *in vitro* xem xét tiềm năng giảm phát thải CH_4 dạ cỏ của các dầu thiết yếu và các thành phần của chúng (Calsamiglia và cs., 2008; Benchaar và cs., 2009). Không may là, có rất ít các nghiên cứu tiếp tục làm trên gia súc (*in vivo*) sau khi kết thúc thí nghiệm *in vitro*. Trong hầu hết các trường hợp, các dầu thiết yếu và các thành phần của chúng đã không có ảnh hưởng đến sản xuất CH_4 ở dạ cỏ (Beauchemin và McGinn, 2006; Benchaar và cs., 2007; Van Zijderveld và cs., 2011c).

1.4.2.4. Bổ sung lipid

Có rất nhiều bằng chứng cho thấy lipid (dầu thực vật và mỡ) làm giảm sản xuất CH_4 trong dạ cỏ.

Phân tích 38 nghiên cứu cho thấy một khuynh hướng ổn định giảm DMI với tất cả các loại lipid bổ sung vào khẩu phần và tăng năng suất sữa (Rabiee và cs., 2012). Sự phối hợp giữa giảm DMI và ổn định hoặc tăng năng

suất sữa (giả sử rằng không có giảm mỡ sữa xảy ra) sẽ làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn và kết quả làm giảm CH₄ sản xuất ra tại dạ cỏ.

Tác động ức chế lớn hơn của axit béo chưa no (chưa bão hòa) so với axit béo no đến hoạt động của vi sinh vật dạ cỏ được Palmquist và Jenkins (1980) và Nagaraja và cs. (1997) phát hiện nhưng dường như khi áp dụng để giảm sản sinh CH₄ ở hầu hết các nghiên cứu cho thấy axit béo chưa no (chưa bão hòa) có tác động giảm phát thải CH₄ nhiều hơn so với axit béo trong nghiên cứu của Doreau và cs. (2011a).

Tổng kết nhiều số liệu của Moate và cs. (2011) và Grainger và Beauchemin (2011) cũng cho biết, lượng CH₄ sản xuất ra trong dạ cỏ giảm khi bổ sung lipid. Moate và cs. (2011) cho thấy, có quan hệ giữa mỡ bổ sung vào khẩu phần và CH₄ sản xuất ra trong dạ cỏ tính trên một đơn vị DMI (vật chất khô ăn vào) như sau:

$$CH_4 \text{ (g/kg DM)} = \exp [3,15(\pm 0,052) - 0,0035 (\pm 0,00061) \times \text{mỡ, g/kg DM}]$$

Grainger và Beauchemin (2011) đã phân tích số liệu của 27 nghiên cứu và kết luận thấy rằng trong phạm vi bổ sung như thực tế hiện đang áp dụng nhỏ hơn 8% mỡ trong khẩu phần thì cứ 10g mỡ/kg tăng lên trong khẩu phần sẽ làm giảm 1g CH₄/kg DMI ở bò và 2,6 CH₄/kg DMI ở cừu. Tương tự, Sauvant và cs. (2011) cũng đã thấy có quan hệ nghịch giữa CH₄ sản xuất ra và hàm lượng mỡ của khẩu phần. Các tác giả này cũng không thấy ảnh hưởng của nguồn mỡ đến hiệu quả giảm phát thải CH₄.

Trong một số nghiên cứu, lipid đã có ảnh hưởng đáng tin cậy và tương quan âm (-) với lượng thức ăn ăn vào (Martin và cs., 2008), đây là một tác động cần cân nhắc cẩn thận. Một tác động khác với lipid cũng cần quan tâm đó là, khi bổ sung lipid tăng cường tiềm năng giảm phát thải CH₄ đi song song với giảm mỡ sữa và protein sữa (Mathew và cs., 2011). Một số loại lipid như dầu

dừa làm giảm lượng chất khô ăn vào và tỷ lệ tiêu hóa xơ rất nhiều, kết quả là năng suất sữa và mỡ sữa cũng giảm rất mạnh ở bò sữa (Hristov và cs., 2004, 2009, 2011b; Lee và cs., 2012b; Hollmann và Beede, 2012), mặc dù chúng vẫn là tác nhân giảm sản xuất CH_4 dạ cỏ (Machmüller và Kreuzer, 1999; Machmüller, 2006; Hristov và cs., 2009). Hầu hết các axit béo mạch dài bão hòa ($\text{C}_{16:0}$; $\text{C}_{18:0}$ và $\text{C}_{18:1}$) cũng gây giảm lượng chất khô thức ăn ăn vào, năng suất sữa và làm giảm mỡ sữa rất mạnh (từ 3,10 đến 2,51 %) (Hollmann và Beede, 2012). Như vậy, các loại lipid này không nên sử dụng để giảm phát thải mêtan.

Các nghiên cứu về ảnh hưởng của bổ sung lipid đến năng suất gia súc không được nhất quán lắm. Tổng quan của Chilliard và Ferlay (2004) kết luận rằng ở hầu hết các nghiên cứu năng suất sữa tăng ở bò sữa khi bổ sung lipid. Ở bò vỗ béo, tổng quan của Clinquart và cs. (1995) khuyến cáo rằng, giảm tỷ lệ tiêu hóa ở bò vỗ béo bổ sung lipid nhưng tăng trọng và tiêu tốn thức ăn/kg tăng trọng lại được cải thiện. Khuyến cáo này dựa trên phân tích bộ số liệu của 31 nghiên cứu, 105 nghiệm thức, trong các nghiên cứu này bổ sung dầu thực vật là yếu tố chính được thí nghiệm. CH_4 sản xuất ra trong dạ cỏ trung bình là 19,5 g/kg chất khô thức ăn ăn vào ($\text{SD} = 7,2$) so với đối chứng không bổ sung, CH_4 sản xuất ra/1 đơn vị chất khô thức ăn ăn vào đã giảm 20% ($\text{SD} = 13,9$), min = 2 % và max = 65 % (Machmüller và Kreuzer, 1999). Chất khô ăn vào đã giảm 5,6 % ($\text{SD} = 6,6$), min = 0,1 và max = 26 %.

Tính kinh tế của việc bổ sung lipid vào khẩu phần gia súc nhai lại cũng cần được cân nhắc kỹ. Giá dầu thực vật hiện đang tăng trên thị trường thế giới trong 10 năm qua. Câu hỏi đặt ra ở đây là bổ sung lipid vào khẩu phần để giảm phát thải mêtan hiện có kinh tế không và tương lai thì sao.

Mặc dù bổ sung dầu, mỡ vào khẩu phần với mục đích giảm phát thải mêtan còn đang tranh luận, các phụ phẩm nhiều dầu từ công nghiệp sản xuất nhiên liệu sinh học (bã rượu, bia khô hay ứot và các bột hạt có dầu đã tách chiết dầu bằng cơ khí có thể là các thức ăn tự nhiên giúp giảm thiểu phát thải mêtan. McGinn và cs. (2009) đã báo cáo rằng, bã bia rượu khô khi thay thế hạt đại mạch đã làm giảm phát thải mêtan đến 24% ở bò thịt.

Ảnh hưởng của bã bia rượu đến sản sinh mêtan ở dạ cỏ luôn luôn không ổn định, mà phụ thuộc nhiều vào các phân dinh dưỡng còn lại của khẩu phần. Đã có rất nhiều nghiên cứu đưa ngô có hàm lượng dầu cao ủ chua vào khẩu phần bò sữa ở Mỹ.

1.4.2.5. Giảm thiểu phát thải khí nhà kính từ các hệ thống chăn nuôi dựa trên nguồn thức ăn chất lượng thấp

Thức ăn chất lượng thấp như các phụ phẩm cây trồng, cỏ chất lượng thấp là những thức ăn quan trọng, cơ sở cho gia súc nhai lại ở các nước đang phát triển (Blümmel và cs., 2009). Nguồn thức ăn sẵn có trong các hệ thống chăn nuôi trồng trọt hỗn hợp có thể được chia thành thức ăn xanh (cỏ tự nhiên và cây thức ăn), phế phụ phẩm cây trồng từ cây ngũ cốc, cây họ đậu, rom lúa và các thức ăn tính (hạt, khô dầu, cám) (Blümmel và cs., 2009).

Nhiều kỹ thuật và chiến lược để nâng cao giá trị dinh dưỡng của các thức ăn chất lượng thấp đã được khuyến cáo áp dụng. Devendra và Leng (2011); Tarawali và cs. (2011) cho rằng áp dụng các kỹ thuật và chiến lược để nâng cao giá trị dinh dưỡng của các thức ăn chất lượng thấp cần được xem xét trong các hệ thống canh tác hỗn hợp chăn nuôi-trồng trọt. Ở các nước đang phát triển, đa số nông dân hoạt động trong các hệ thống chăn nuôi-trồng trọt hỗn hợp và hiện có gần ba tỷ người phụ thuộc vào các hệ thống này để có được lương thực thực phẩm cho mình (Herrero và cs., 2010). Ở những nước

này số lượng các hệ thống chăn nuôi thâm canh rất nhỏ. Trên phạm vi rộng, chiến lược giảm thiểu phát thải mêtan cho những hệ thống sản xuất ở những nước này cũng vẫn sẽ tương tự như chiến lược này ở các nước phát triển. Tuy nhiên, các lựa chọn cho giảm thiểu ở hệ thống chăn nuôi kết hợp trồng trọt trong nông hộ sẽ có các khác biệt vì các nguyên nhân sẽ thảo luận dưới đây.

Hầu hết các hệ thống chăn nuôi vừa nêu ở các nước đang phát triển đang phải đối mặt với một hoặc vài mùa vụ thức ăn sẵn có không nhiều, chất lượng lại thấp vì thế chăn nuôi ở những mùa này hoặc vắng bóng hoặc năng suất giảm vì gia súc chỉ sống dựa vào một nguồn thức ăn duy nhất là phế phụ phẩm trồng trọt. Vào vụ trồng trọt hay thu hoạch thức ăn sẵn có nhiều hơn, chất lượng tốt hơn nhưng lao động lại thiếu, đồng cỏ chăn thả sẵn có thể đã ngăn cản nuôi dưỡng tốt (Tarawali và cs., 2011; Owen và cs., 2012). Việc nhập khẩu thức ăn chất lượng cao (thức ăn tinh và cỏ chất lượng cao) và đưa vào sử dụng ở các hệ thống này quá nhỏ bé (Blümmel và cs., 2009).

Trong đa số các hệ thống chăn nuôi nhỏ lẻ nằm trong hỗn hợp trồng trọt-chăn nuôi này, mục tiêu chủ yếu là sản xuất trồng trọt, gia súc chỉ đơn giản là một phương tiện để đạt được mục tiêu chủ yếu nêu trên. Các đầu vào về lao động, tiền bạc và đất đai chủ yếu là cho trồng trọt. Trong các hệ thống này chăn nuôi phải cạnh tranh với trồng trọt (thâm canh) về đầu tư. Chăn nuôi ở các nước đang phát triển không những có giá trị tạo ra thực phẩm mà còn là nguồn phân bón cho trồng trọt, nguồn sức kéo, đầu tư và nguồn bảo hiểm tại chỗ (Udo và cs., 2011), các nguồn này sẽ lớn khi tăng qui mô đàn.

Lựa chọn giảm thiểu phát thải phù hợp nhất cho các hệ thống trồng trọt-chăn nuôi nhỏ lẻ là tăng năng suất cá thể gia súc thông qua cung cấp thức ăn tốt hơn. Giảm số lượng gia súc, đặc biệt trong các hệ thống tự cung tự cấp, cho phép cung cấp đủ thức ăn cho đàn gia súc được chọn lọc theo tiềm năng

di truyền khi chúng được quan tâm đầy đủ về thú y (Tarawali và cs., 2011). Theo đó, dẫn đến sẽ cải thiện năng suất cá thể cũng như năng suất của đàn (Tarawali và cs., 2011). Trong một kịch bản như vậy, phát thải mêtan sẽ giảm cho cả hai, đó là cho tổng đàn gia súc và cho mỗi một đơn vị sản phẩm.

Lựa chọn giảm thiểu phát thải mêtan kiểu này sẽ mâu thuẫn với mong muốn của các nông hộ có đàn gia súc lớn hơn không phải vì mục tiêu sản xuất. Như vậy, giảm kích cỡ đàn đòi hỏi phải có các biện pháp như cơ giới hóa, sử dụng phân bón hóa học, chế độ vay vốn và bảo hiểm hợp lý (Udo và cs., 2011). Các biện pháp điều hành (thuế và hợp đồng - quota) có thể sẽ giảm lợi ích nuôi quá nhiều gia súc. Lựa chọn giải pháp giảm thiểu này được khuyến cáo ở mức cao bởi vì nó mang lại lợi ích cho đầu ra của chăn nuôi và phát thải mêtan và giúp giảm thấp mức độ tác động của chăn nuôi với môi trường, nguồn nước và sử dụng đất nông nghiệp. Tuy nhiên, việc áp dụng rộng rãi giải pháp giảm thiểu phát thải cũng là một thách thức lớn vì các nguyên nhân về kinh tế và xã hội như đã thảo luận ở trên. Cung cấp đủ thức ăn có chất lượng tương đối tốt trong khẩu phần sẽ tăng năng suất cá thể gia súc. Thức ăn xanh như cỏ và các cây thức ăn đa mục đích như cỏ voi (*Pennisetum purpureum*) là các cây thức ăn có thể dùng ở phạm vi rộng (Saleem, 1998; Mekoya và cs., 2008; Oosting và cs., 2011; Tarawali và cs., 2011; Owen và cs., 2012). Tuy nhiên, những cây thức ăn và cỏ này cạnh tranh gay gắt với các cây lương thực thực phẩm về đất đai và nước.

Đóng góp tích cực của các cây thức ăn họ đậu đối với độ màu mỡ của đất là hoàn toàn có thể đạt được vì khả năng cố định đạm của các cây này. Các hợp chất polyphenols – các hợp chất có hoạt tính sinh học trong các cây thức ăn họ đậu sẽ có ảnh hưởng tích cực đến phát thải CH_4 cần được tiếp tục nghiên cứu (Owen và cs., 2012).

Các loại chất dinh dưỡng bổ sung khác cung cấp một lượng nhỏ các chất dinh dưỡng để tăng lượng thức ăn ăn vào, tăng khả năng tiêu hóa và sử dụng thức ăn cũng là các giải pháp tốt (Oosting và cs., 1994, 1995; Owen và cs., 2012). Tảng liềm đa dinh dưỡng urê - rỉ mật (urea-molasses multi-nutrient block) phát triển ở châu Á là một ví dụ về bổ sung nitơ cho các khẩu phần có nghèo nitơ (Sudana và Leng, 1986; Owen và cs., 2012). Vai trò của các tảng liềm này (có nitrate) như là một giải pháp giảm phát thải CH_4 đã được thảo luận ở phần các chất nhận electron ở trên. Khoáng chất khác như Ca, P, Cu và Zn là các chất dinh dưỡng giúp cải thiện sử dụng các thức ăn nghèo dinh dưỡng. Tuy nhiên, hạn chế của các chất dinh dưỡng kể trên là chúng chỉ có tác dụng khi các thức ăn nghèo dinh dưỡng là thức ăn duy nhất trong khẩu phần. Khi có thức ăn xanh và thức ăn tinh trong khẩu phần thì tác dụng của các chất như Ca, P, Cu và Zn sẽ hạn chế và không kéo dài, có nghĩa là làm hiệu quả bổ sung thấp.

Sarnklong và cs. (2010), Owen và cs. (2012) đã tổng quan và thảo luận về các lựa chọn để xử lý các phế phụ phẩm nông nghiệp. Rơm lúa, một phế phụ phẩm trồng trọt có thể coi là một trong số các loại thức ăn nghèo dinh dưỡng. Xử lý hóa học (urê, NH_3 hoặc NaOH) và xử lý sinh học (nuôi nấm trực tiếp trên rơm, hay dùng enzyme của nấm xử lý rơm), tất cả đều nhằm mục đích nâng cao tỷ lệ tiêu hóa của rơm bằng cách phá vỡ cấu trúc vách tế bào, làm cho phần hemicellulose và cellulose sẵn sàng hơn cho tiêu hóa và lên men ở dạ cỏ. Xử lý rơm bằng urê (3-5% và ủ trong ít nhất 1 tuần) là cách xử lý phổ biến nhất được khuyến cáo cho các nước phát triển. Ammonia được giải phóng từ urê và môi trường kiềm sẽ phá vỡ cấu trúc vách tế bào thực vật làm tăng lượng thức ăn ăn vào và tỷ lệ tiêu hóa của rơm. Ngoài ra, rơm ủ urê cũng cung cấp thêm nitơ để nâng cao giá trị dinh dưỡng của rơm.

Các vấn đề về kinh tế, lao động và khả năng thực hành là các yếu tố chủ yếu cản trở việc áp dụng kỹ thuật này trong thực tế (Schiere, 1995; Owen và cs., 2012) mặc dù đã có hàng nhiều thập kỷ nghiên cứu và chuyển giao (Sundstøl và Owen, 1984). Roy và Rangnekar (2006) đã mô tả một trường hợp rất thành công trong áp dụng rơm ủ urê tại Ấn Độ, tại đây kỹ thuật này đã giúp nông dân vượt qua trở ngại thiếu thức ăn ở vùng nhiệt đới ẩm. Tuy nhiên, nếu các điều kiện kinh tế xã hội cho phép có được các lợi ích về áp dụng rơm ủ urê vẫn còn chưa biết rõ liệu kỹ thuật này có làm giảm phát thải CH_4 cho một đơn vị sản phẩm chăn nuôi hay không. Tất nhiên, nếu tỷ lệ tiêu hóa của thức ăn tăng thì năng suất gia súc cũng tăng và CH_4 sản sinh tính trên một đơn vị sản phẩm chăn nuôi sẽ giảm.

Trong một vài trường hợp, xử lý hóa học phế phụ phẩm có thể làm tăng lượng thức ăn ăn vào và tỷ lệ tiêu hóa nhưng lại không có ảnh hưởng đến năng suất gia súc. Trong một thí nghiệm với bò đực thiên lai hướng thịt, xử lý cỏ gà khô với NH_3 đã làm tăng khả năng tiêu hóa chất khô nhưng đã không thấy được cải thiện tăng trọng trung bình hàng ngày (ADG) và hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR – Feed Conversion Ratio) (Krueger và cs., 2008). Ảnh hưởng của xử lý thường có quan hệ nghịch với chất lượng thức ăn, ảnh hưởng của xử lý sẽ cao hơn cho thức ăn chất lượng thấp và ngược lại, đặc biệt là khi tỷ lệ tiêu hóa của thức ăn đã xấp xỉ 50% (Schiere, 1995). Cần chú ý rằng, 100 % urê khi dùng ủ rơm sẽ bị thủy phân thành NH_3 trong một thời gian ngắn và phần lớn nitơ (N) trong urê vì thế sẽ mất mát dưới dạng NH_3 bay vào không khí khi mở túi ủ (Makkar và Singh, 1987). Giải phóng NH_3 vào không khí sẽ là nguồn gây ô nhiễm môi trường, có ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Câu hỏi là xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp có ảnh hưởng đến lên men ở dạ cỏ không? Oosting và cs. (1993), đã đo đặc phát thải CH_4 ở cừu và bò được ăn rơm lúa mì xử lý NH_3 đến phát thải và không xử lý trong buồng hô hấp

(respiration chambers), đã không thấy ảnh hưởng của xử lý NH_3 đến phát thải mêtan (CH_4).

Xử lý dùng nấm có nhiều hứa hẹn ở qui mô phòng thí nghiệm, nhưng quá trình kiểm soát trong sản xuất rất khó khăn vì một khối lượng vật liệu cần xử lý (Walli, 2011). Hơn thế nữa, trong các thí nghiệm nuôi dưỡng, các chất dinh dưỡng sẵn có và sử dụng dinh dưỡng ở gia súc đã không được cải thiện, đây có thể là lý do làm cho kỹ thuật này chưa được ứng dụng trong thực tế (FAO, 2011a). Mất mát chất khô và giảm giá trị dinh dưỡng của phụ phẩm trồng trọt trong quá trình sử lý nấm rất lớn nên tính khả thi thấp (Lynch và cs., 2012).

Nông dân có thể là những người nhận ra và xem xét chất lượng rơm lúa để có các quyết định của họ trong trồng lúa (Parthasarathy Rao và Hall, 2003; Schiere và cs., 2004; Parthasarathy Rao và Blümmel, 2010). Rơm kê, thân cao lương, ngô có giá trị dinh dưỡng cao hơn rơm lúa, rơm lúa mỳ và rơm lúa mạch (Grando và cs., 2005; Blümmel và cs., 2010). Trong cùng một loại cây, sản lượng (rơm), chất lượng phụ phẩm rất biến động nên chọn và nhân giống lúa trồng để cải thiện chất lượng rơm mà không ảnh hưởng đến năng suất hạt sẽ là các giải pháp hữu hiệu (Grando và cs., 2005; và Blümmel và cs., 2010). Tăng sử dụng các phế phụ phẩm nông nghiệp làm thức ăn có thể sẽ làm giảm lượng chất hữu cơ (organic matter - OM) (Tarawali và cs., 2011). Tạo các giống lúa có chất lượng rơm tốt là một tiềm năng đầy hứa hẹn tăng năng suất gia súc và giảm phát thải CH_4 ở nam Ấn Độ (Blümmel và cs., 2010).

1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

1.5.1. Tình hình nghiên cứu giảm thiểu mêtan sinh ra từ chăn nuôi bò thịt ở trên thế giới

Đã có nhiều nghiên cứu trước đây nhằm giảm thải khí CH_4 từ chăn nuôi bò nói riêng và gia súc nhai lại nói chung.

Johnson và cs. (1972) thiết kế thí nghiệm kiểu ô vuông Latin trên bò đực thuần ăn BCM khoảng 1,1g/100 kg khối lượng/ngày và không thấy ảnh hưởng của BCM đến lượng thức ăn ăn vào, tăng khối lượng hoặc tỷ lệ tiêu hóa, nhưng các tác giả lại thấy có sự giảm nồng độ mêtan rất đáng kể trong khí dạ cỏ ngay sau 3 giờ cho ăn và nồng độ này giảm tới 50% lúc 15 giờ sau khi ăn nhưng đến 24 giờ sau khi ăn thì ảnh hưởng đến nồng độ CH_4 không còn tồn tại nữa.

Knight và cs. (2011) cho thấy sự giảm CH_4 ở dạ cỏ diễn ra rất mạnh và tức thì ở bò cặn sữa cho ăn chloroform. Ảnh hưởng của chloroform kéo dài đến 42 ngày mặc dù lượng CH_4 sản xuất ra trong dạ cỏ tăng từ từ đến mức bằng 62% lúc chưa cho ăn chloroform.

Nolan và cs. (2010), van Zijderveld và cs. (2010; 2011a, b), cho thấy khi nitrate được đưa từ từ vào khẩu phần đã cho phép có sự thích ứng và không thấy xuất hiện vấn đề gì về sức khỏe.

Leng (2008) cũng chỉ ra rằng sulphur có thể tương tác với trao đổi nitrate trong dạ cỏ và đã thảo luận vai trò tiềm năng của molybden và cách bổ sung nitrate vào khẩu phần gia súc nhai lại (thông qua các khối liềm hoặc thay thế NH_3 lỏng và urea trong xử lý rơm).

Cockwill và cs. (2000) cho thấy, ví dụ, lượng bánh dinh dưỡng rỉ mật protein của bò cái thịt trên đồng cỏ trung bình là 445 g/con/ngày nhưng dao động từ 0 đến 1.650 g/con/ngày ($\text{SEM} = 438$ g/con/ngày).

Leng (2008) tổng hợp số liệu của Faulkner và Hutjens (1989) cho thấy, một số loại thức ăn có hàm lượng nitrate cao từ 2,6 - 2,9% tương ứng với ngô ủ và cỏ Xu Đăng tươi chặt nhỏ. Ở mức 2% chất khô khẩu phần (dry matter - DM), ví dụ, ngô ủ trong khẩu phần là 25%, một bò sữa ăn vào 25 kg DM/ngày thì lượng nitrate ăn vào từ ngô ủ lên đến 125g/ngày. Lượng nitrate trong cỏ chăn thả và cỏ trồng phụ thuộc vào lượng phân nitơ sử dụng. Theo Lovett và cs. (2004), cứ mỗi 1% protein thô tăng lên (từ 13 lên 23%) ở cỏ Ryegrass do bón phân nitơ thì lượng nitrate trong cỏ tăng tuyến tính 0,035g/kg DM. Vì lý do này, rất cần tính mức độ nitrate đã có sẵn trong khẩu phần cơ sở trước khi bổ sung nitrate.

Kurihara và cs., 2009 đã báo cáo rằng, phát thải N_2O trung bình một ngày ở bò cái nuôi trong buồng hô hấp là 10,0 mg N_2O -N. Trên cơ sở các số liệu này, các tác giả đã tính được lượng N_2O phát thải trong một ngày và cả năm tương ứng từ một bò là $5,2 \pm 4,15$ mg và $2,64 \pm 1,65$ g N_2O -N. Lượng nitrate ăn vào từ bổ sung thức ăn có thể ảnh hưởng đến N_2O phát thải từ dạ cỏ vẫn còn chưa rõ và cần nghiên cứu thêm.

Foley và cs. (2009) bổ sung fumarate cho thấy không ảnh hưởng đến sản sinh CH_4 dạ cỏ, có một vài trường hợp, lượng thức ăn ăn vào giảm. Nghiên cứu của Kolver và Aspin (2006) trên bò sữa được chăn thả ở đồng cỏ có tỷ lệ tiêu hóa cao đã không thấy có ảnh hưởng nào của fumarate đến lượng thức ăn ăn vào, chất rắn trong sữa (mỡ, protein), tổng CH_4 sản xuất ra trong dạ cỏ khi dùng fumarate với liều tương đối cao (5% DM khẩu phần).

Theo các quan sát của Grainger và cs. (2009a) với bò sữa chăn thả trên đồng cỏ được bổ sung thức ăn hạt thì phát thải CH_4 đã giảm tới 30%, nhưng năng suất sữa chỉ giảm 10%.

Phân tích một số thí nghiệm (A meta-analysis) *in vivo* với tanins của Jayanegara và cs. (2012) cho thấy: có một quan hệ khá chặt chẽ giữa hàm lượng tanin trong khẩu phần và lượng CH_4 sản xuất ra trên một đơn vị chất hữu cơ tiêu hóa. Tuy nhiên, các tác giả này cho thấy, có một khuynh hướng giảm lượng thức ăn ăn vào và giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê tỷ lệ tiêu hóa ($P = 0,08$), đặc biệt là tiêu hóa protein thô (CP - Crude Protein) khi hàm lượng tanin trong thức ăn tăng lên (giảm tỷ lệ tiêu hóa 0,16 % cho mỗi g tanin tăng thêm/kg vật chất khô khẩu phần). Đối với NDF, tỷ lệ tiêu hóa NDF giảm 0,11 % cho mỗi g tanin tăng thêm/kg vật chất khô khẩu phần.

Kết quả phân tích từ rất nhiều số liệu (meta-analysis) cho C_3 và C_4 của cỏ và cỏ họ đậu vùng ẩm và vùng lạnh do Archimède và cs. (2011) tiến hành cho thấy, sản xuất CH_4 ở gia súc cho ăn thức ăn họ đậu có hàm lượng tanin cao thấp hơn so với gia súc ăn thức ăn họ đậu có hàm lượng tanin thấp (37,2 và 52,2 lít CH_4 /kg chất hữu cơ tiêu hóa).

Trong các nghiên cứu với các khẩu phần chất lượng thấp có chứa tanin cô đặc (Waghorn, 2008), lượng thức ăn ăn vào và năng suất gia súc không bị ảnh hưởng tiêu cực.

Nghiên cứu của Broderick và cs. (2012) cho thấy, không có ảnh hưởng đáng tin cậy của cỏ birdsfoot trefoil chứa tanin thấp cao và trung bình đến năng suất sữa của bò sữa. Hiệu quả sử dụng thức ăn và hiệu quả sử dụng thức ăn cho 1 kg sữa hiệu chỉnh trong nghiên cứu này giảm ở khẩu phần cỏ *birdsfoot trefoil* ủ chua so với khẩu phần cỏ alfalfa ủ chua.

Grainger và cs. (2009a) đã dùng tanin cô đặc (163 và 326 g/ngày) để bổ sung vào khẩu phần cho bò sữa trong 5 tuần liên tiếp và thấy có sự giảm đáng tin cậy về thống kê về lượng mêtan sản xuất ra ở dạ cỏ bò được bổ sung tanin,

nhưng lại không thấy ảnh hưởng của tanin nếu tính lượng CH_4 sản sinh ra/một đơn vị mỡ sữa và protein sữa.

Benchaa và Greathead (2011) kết luận rằng, một vài loại dầu thiết yếu (dầu tỏi và các dẫn xuất và cinnamon) đã làm giảm sản sinh CH_4 *in vitro*. Các hợp chất này đã không được nghiên cứu nhiều trong điều kiện *in vivo* và không có bằng chứng là chúng có thể được sử dụng thành công như một chất ức chế sinh mêtan ở dạ cỏ. trong một vài trường hợp như với lá cây *Origanum vulgare*, ảnh hưởng đến giảm sản xuất mêtan là đáng kể và có khuynh hướng là sử dụng lá này làm tăng năng suất sữa và hiệu quả sử dụng thức ăn ở bò sữa (Tekippe và cs., 2011; Hristov và cs., 2013), nhưng các kết quả này cần phải được chứng minh là vẫn đúng cho các thí nghiệm dài hơi hơn.

Eugene và cs. (2008) báo cáo rằng, khi bổ sung lipid vào khẩu phần đã làm giảm sản sinh CH_4 trong dạ cỏ bò sữa 9%, nhưng cũng làm giảm 6,4% lượng chất khô ăn vào (DMI-Dry Matter Intake), kết quả là, không có sự khác biệt về CH_4 tính trên một đơn vị DMI. Tuy nhiên, các tác giả này cũng báo cáo rằng vì không có ảnh hưởng đến năng suất sữa hiệu chỉnh đi kèm với giảm DMI nên kết quả là có khuynh hướng tăng hiệu quả sử dụng thức ăn khi bổ sung lipid (dầu thực vật). Thêm nữa, khi tính toán cho một đơn vị sữa đã hiệu chỉnh theo mỡ sữa, CH_4 sản xuất ra tại dạ cỏ giảm khi bổ sung lipid (0,82 so với 0,75 MJ năng lượng trong CH_4/kg sữa hiệu chỉnh, $P = 0,04$; $n = 25$).

Beauchemin và cs. (2007b) đã so sánh mỡ động vật và dầu hướng dương (có khoảng 48% a xít béo không no), cả hai được bổ sung ở mức 3,4% vật chất khô (DM) khẩu phần cho thấy, không có ảnh hưởng đến khả năng tiêu hóa chất khô (DMD-Dry Matter Digestibility) và khả năng tiêu hóa NDF (NDFD), lượng thức ăn ăn vào và tăng trọng trung bình (ADG) ở bò. Lượng CH_4 sản xuất ra ở dạ cỏ giảm 12% thấy ở cả hai loại mỡ và không thấy ảnh

hưởng của a xít béo không no. Trong một nghiên cứu khác của cùng nhóm tác giả (Beauchemin và cs., 2009b), khi đưa các hạt có dầu đã nghiền vào khẩu phần bò tiết sữa ở mức 9 đến 10% vật chất khô (DM) khẩu phần (6,7 đến 7,3% mỡ thô) đã thấy CH_4 sản sinh ra trên 1 đơn vị sữa đã hiệu chỉnh giảm 15%. Van Zijderveld và cs. (2011c) đã không thấy ảnh hưởng của nguồn a xít béo đến hiệu quả giảm phát thải khí mêtan.

Woodward và cs. (2006) thử xem xét ảnh hưởng của dầu thực vật và dầu cá đến năng suất sữa và phát thải CH_4 trong thí nghiệm ngắn ngày (14 ngày) và dài ngày (12 tuần). Kết quả cho thấy, lipid đã giảm CH_4 một cách đáng tin cậy về mặt thống kê trong thời gian ngắn (14 ngày), nhưng ảnh hưởng này không thấy sau 12 tuần ở thí nghiệm dài ngày. Các tác giả trên đưa ra kết luận, lipid không thích hợp cho mục đích giảm phát thải mêtan ở bò sữa và cần thận trọng khi dùng lipid để giảm phát thải ở bò sữa.

Holter và cs. (1992) thấy có sự giảm CH_4 đáng tin cậy về thống kê trong một thí nghiệm kéo dài 16 tuần ở bò vắt sữa khi khẩu phần được bổ sung hạt bông cả vỏ (4,1 và 6,8 % mỡ của khẩu phần), nhưng ảnh hưởng có vẻ mất đi khi sản xuất CH_4 ở dạ cỏ được tính trên 1 đơn vị vật chất khô ăn vào hay năng suất sữa. Tuy nhiên, hạt bông cả vỏ được báo cáo là một thức ăn rất hiệu quả để giảm phát thải CH_4 lâu dài trong nghiên cứu của Grainger và cs. (2008), sau 5 và 12 tuần (Grainger và cs., 2010b).

Grainger và Beauchemin (2011) tiến hành 6 nghiên cứu dài hơn (6 đến 36 tuần, chủ yếu trên bò sữa) và đã kết luận rằng, hiệu quả của bổ sung mỡ trong khẩu phần đến sản xuất CH_4 ở dạ cỏ là khá rõ rệt, tuy nhiên, ảnh hưởng này không nhất quán trong 6 thí nghiệm. Ảnh hưởng của dầu thực vật bổ sung vào khẩu phần đến giảm phát thải CH_4 cũng được quan sát thấy trong các

nghiên cứu của Martin và cs. (2011), mặc dù kết quả này không thấy ở bò đực non (Eugène và cs., 2011).

Một nghiên cứu của Atwell và cs. (1988) về ảnh hưởng của hạt ngô có nhiều dầu và ngô ủ chua nhiều dầu và ảnh hưởng kết hợp của chúng đến bò sữa cho thấy, không có lợi ích gì về năng suất sữa khi cho ăn như trên, thực tế hiệu quả sử dụng thức ăn còn giảm. Kết quả tương tự cũng được qua báo cáo của LaCount và cs. (1995) và Whitlock và cs. (2003). Tuy vậy, Weiss và Wyatt (2000) lại thấy năng suất sữa tăng khi sử dụng ngô ủ chua có nhiều dầu (ở mức DMI tương tự) nhưng lại thấy protein sữa giảm. Với các đáp ứng không như mong đợi, năng suất giảm và giá cả cao, ngô có hàm lượng dầu cao không phải là một thức ăn nên lựa chọn như là nguồn dầu có nhiều axit béo chưa no để giảm phát thải khí nhà kính ở gia súc nhai lại.

Hardin (1968), Zemmeling và cs. (2003), Abegaz và cs. (2007), và Blümmel và cs. (2009) đã quan sát thấy ảnh hưởng lớn trong sử dụng và chia sẻ các nguồn thức ăn chăn nuôi hiện có bởi quá nhiều gia súc: (i) sự sẵn có của nguồn thức ăn có chất lượng tốt và trung bình là không đủ để nuôi gia súc; (ii) thức ăn chất lượng thấp có trong khẩu phần dẫn đến năng suất của các thể gia súc cũng như toàn đàn không đạt tối ưu. Vì thức ăn thì không đủ, đàn gia súc lại lớn đã tạo sức ép cho việc sử dụng quá mức các nguồn thức ăn chất lượng thấp.

1.5.2. Tình hình nghiên cứu giảm thiểu mêtan sinh ra từ chăn nuôi bò thịt ở Việt Nam

Từ trước đến nay, trong lĩnh vực thức ăn chăn nuôi chúng ta có hai quan điểm trái chiều nhau về vai trò cũng như tác dụng của tanin. Một số nhà khoa học cho rằng tanin là một hợp chất kháng dinh dưỡng vì tanin kết hợp với protein của thức ăn và với cả enzym đường tiêu hoá làm giảm tỷ lệ tiêu

hoá protein thức ăn, giảm thu nhận thức ăn, giảm sinh trưởng, giảm sản lượng của vật nuôi (Dương Thanh Liêm, 2008) và cần phải khắc phục ảnh hưởng có hại của tanin bằng cách xử lý kiềm hoặc phối hợp thức ăn chứa tanin với sunphat sắt hoặc polyethylene glycol - 4000 (PEG-4000) (Vũ Duy Giảng, 2001). Ngược lại, theo Nguyễn Xuân Trạch (2003) lại cho rằng bổ sung tanin vào khẩu phần ăn của gia súc nhai lại ở mức thấp (20-40 g/kg vật chất khô thức ăn) sẽ làm tăng hiệu quả sử dụng protein của gia súc. Để đạt được hai mục tiêu giảm thiểu mêtan và duy trì được tỷ lệ tiêu hóa của khẩu phần, chúng ta cần phải xác định được nguồn tanin cũng như tỷ lệ bổ sung vào thích hợp khẩu phần ăn của gia súc nhai lại.

Trong cây, ở các bộ phận càng được tiếp xúc nhiều với ánh sáng mặt trời thì hàm lượng tanin càng cao. Trong khi đó, Việt Nam là nước nằm trong khu vực nhiệt đới, có thời gian chiếu sáng hàng năm lớn thì hầu hết các loài thực vật đều chứa một hàm lượng tanin nhất định. Đặc biệt các loài thực vật có vị chát thì có hàm lượng tanin khá cao. Ví dụ như tanin của lá chè chiếm 12,68% vật chất khô (Lê Tự Hải, 2010), trong cây keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) và cây kim phượng (*Bonducpina pulcierrina*) có hàm lượng tanin lần lượt là 16,63 và 7,69% vật chất khô (Hồ Thị Liễu, 2004). Như vậy ta có thể sử dụng nguồn tanin sẵn có từ thực vật bổ sung vào khẩu phần ăn của gia súc nhai lại để giảm thiểu khí mêtan.

Năm 2011, trong khuôn khổ của đề tài thường xuyên của bộ môn Dinh dưỡng và Thức ăn chăn nuôi - Viện chăn nuôi đã tiến hành các thí nghiệm *in vitro* xác định động thái sinh khí của 4 loại cây họ đậu (chè đại, keo đậu, đậu Sơn Tây, thân lá lạc sau thu hoạch) và ngọn lá sắn được phối trộn với chất nền (50% rơm khô 50% cám gạo tính theo vật chất khô) theo các tỷ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy hàm lượng tanin trong các loại thức ăn này khá cao, dao động từ 2,5 – 5% VCK. Trong số các loại cây thức ăn này, keo đậu có tác dụng

làm giảm lượng CH_4 sản sinh ra nhiều nhất, đặc biệt với tỷ lệ phối trộn 40% keo đậu có thể là giảm đến 13% so với khẩu phần đối chứng chỉ có rơm và cám gạo.

Năm 2016, trong khuôn khổ của đề tài độc lập cấp Nhà nước (Nghiên cứu các giải pháp khoa học công nghệ giảm thiểu phát thải khí mêtan (CH_4) ra môi trường trong chăn nuôi bò sữa, bò thịt) do tiến sĩ Chu Mạnh Thắng chủ trì, đề tài được thực hiện trên đối tượng bò sữa và bò thịt. Kết quả cho thấy cho thấy: (i) Sử dụng cây ngô ủ chua trong khẩu phần làm thức ăn cho bò đã cải thiện tăng năng suất sữa 5,98% (bò sữa), tăng khối lượng 9,75% (bò thịt) và hiệu quả chuyển hóa thức ăn so với lô ăn khẩu phần ăn truyền thống đồng thời giảm rõ rệt mức độ phát thải mêtan. Cường độ phát thải khí mêtan tính trên 1 kg sữa tiêu chuẩn giảm 17,8% (L/kg FCM-sữa tiêu chuẩn) (bò sữa) và tính trên đơn 1kg thịt sản xuất giảm 13,34% so với bò ăn khẩu phần ăn truyền thống; (ii) Bổ sung thức ăn tinh trong khẩu phần nuôi bò thịt lên 20% và 30% (tỷ lệ % tinh trong khẩu phần) đã làm tăng khả năng tăng trọng của bò cao hơn tương ứng 64,5 và 85,6% và giảm mức độ phát thải CH_4 trên 01 kg thịt sản xuất tương ứng 9,7 và 10,0% so với lô đối chứng (ăn 100% thức ăn thô xanh); (iii) Trong điều kiện chất lượng khẩu phần ở Việt Nam, khi cho bò ăn với mức 100 và 120% cho kết quả là sản lượng sữa trung bình tăng 11,45% và 16,17% với hệ số sụt sữa nằm trong giới hạn 6-10% (bò sữa) và khả năng tăng khối lượng của bò cao hơn tương ứng là 13,3% và 33,3% (bò thịt); đồng thời giảm cường độ phát thải khí mêtan tương ứng từ 10%-15% trên bò cặn sữa và 9%-17% trên bò tiết sữa cũng như tương ứng 8,2% và 21,7% CH_4 thải ra trên 01 kg thịt sản xuất so với bò ăn khẩu phần ăn mức ăn 80% tính theo nhu cầu NRC (Chu Mạnh Thắng và cs., 2016; Trần Hiệp và cs., 2016; Chu Mạnh Thắng, 2017).

1.6. GIỚI THIỆU MỘT SỐ CÂY THỨC ĂN CHỨA TANIN SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

1.6.1. Lá chè (*Camellia sinensis*)

Chè (*camellia sinensis*) xuất xứ từ Đông Á, Nam Á và Đông Nam Á, nhưng ngày nay nó được trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới, trong các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới. Nó là loại cây xanh lưu niên mọc thành bụi hoặc các cây nhỏ, thông thường được xén tỉa để thấp hơn 2 mét (6 ft) khi được trồng để lấy lá. Nó có rễ cái dài. Hoa trà màu trắng ánh vàng, đường kính từ 2,5–4 cm, với 7 - 8 cánh hoa. Lá của trà dài từ 4–15 cm và rộng khoảng 2–5 cm. Lá tươi chứa khoảng 4% caffein và chứa nhiều tanin. Lá non có sắc xanh lục nhạt được thu hoạch để sản xuất trà. Ở thời đoạn đó, mặt dưới lá có lông tơ ngắn màu trắng. Lá già thì chuyển sang màu lục sẫm. Tùy lứa tuổi mà lá trà có thể dùng làm thành phẩm trà khác nhau vì thành phần hóa học trong lá khác nhau. Thông thường, chỉ có lá chồi và 2 đến 3 lá mới mọc gần thời gian đó được thu hoạch để chế biến.

1.6.2. Lá keo tai tượng (*Acacia mangium* Wild)

Keo tai tượng (*Acacia mangium* Wild) là cây gỗ có nguồn gốc ở đông bắc [Queensland](#), Australia. Đây là cây gỗ trung bình, tuổi thành thực thường cao trên 15m, đường kính 40- 50 cm, cây non mới mọc lúc đầu (khoảng 1- 2 tuần tuổi) có lá kép lông chim 2 lần, sau đó mới ra lá thật, lá đơn màu trắng hoặc màu vàng nhạt, lá Keo tai tượng to, rộng khoảng 10 cm có thể dùng cho dê ăn với số lượng hạn chế. Lá có nhiều tanin nên tính ngon miệng thấp. Hoa nhỏ màu trắng hoặc vàng, cụm hoa dạng bông ở nách lá. Quả đậu, dài, xoắn lại nhiều vòng, màu nâu đậm

1.6.3. Lá chè đại (*Trichanthera gigantea*)

Tên khác: cây chè khổng lồ

Tên khoa học: *Trichanthera gigantea*

Nguồn gốc: Colombia

Nhập vào Việt Nam năm 1991

Đặc điểm: Cây *Trichanthera gigantea* thuộc họ *Acanthaceae* và phụ họ *Acanthoideae*, có nguồn gốc từ chân đồi Andean, Colombia và cũng có thể tìm thấy nhiều nơi trên thế giới ở dọc suối hoặc vùng đầm lầy từ Costa Rica đến Nam Mỹ. Là cây thức ăn có nhiều triển vọng vì nó thích hợp với nhiều điều kiện sinh thái khác nhau từ độ cao 0 - 2000 m so với mặt nước biển. Nó có thể thích nghi tốt với điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm với lượng mưa hàng năm từ 1000 đến 2800 mm. Cây có khả năng phát triển tốt ở vùng đất axit (pH: 4,5) và lượng phân bón thấp nhưng phải có khả năng thoát nước cao. Không phải là cây họ đậu nhưng cây *Trichanthera gigantea* có khả năng sinh trưởng cao và chịu cắt toàn bộ nhiều lần. Cây có khả năng phát triển trong điều kiện trồng không được bón phân, có khả năng cố định nitơ ở bộ rễ (Preston, 1991).

Cây gỗ, thân cao 4-5m, sống lâu năm. Thân mọc thẳng, có nhiều mấu lồi nhỏ, phân bố thẳng hàng dọc theo thân tạo nên 2-4 đường bên ở 2 phía của thân. Khi còn non thân mềm mọng nước. Sau 6 tháng sinh trưởng thân hóa gỗ cứng phía ngoài, màu nâu, phía trong mềm, nhưng không hóa bấc. Lá *Trichanthera* màu xanh sẫm mọc đối chéo chữ thập, lá đơn nguyên, mịn và hơi ráp. Khi khô lá ngả màu đen.

Trichanthera gigantea có khả năng ra rễ từ gốc đến ngọn, ngay cả một mấu lá nhỏ. Tuy nhiên không có khả năng tạo thành cây mới. Khả năng nhân giống vô tính của *Trichanthera gigantea* rất nhanh. Trong 6 tháng, từ một cây non ít nhất có thể cho ta 100 cây mới (không tính theo cấp số nhân). *Trichanthera gigantea* chỉ ra hoa ở miền Trung và Nam, nhưng không tạo

thành quả và hạt, ở miền Bắc chưa thấy *Trichanthera gigantea* ra hoa. Cây thường ra hoa vào tháng 12 hàng năm.

Giá trị dinh dưỡng của lá cây *Trichanthera gigantea* cho gia súc khá cao. Hàm lượng protein thô (CP) của lá dao động từ 15 - 22% và hầu hết là protein thật, protein có a xit amin cân bằng như bèo hoa dâu Preston (1995). Hàm lượng canxi đặc biệt cao so với các cây bụi khác (Rosales và Galindo, 1987; Rosales và cs., 1992). Là thức ăn tốt cho gia súc nhai lại, đặc biệt là gia súc cho sữa. Trong lá có nhiều tanin cô đặc (Rosales và cs., 1989).

Bằng phương pháp tiêu hóa dạ cỏ để xác định tỷ lệ tiêu hoá đối với cây *Trichanthera gigantea* cho thấy tỷ lệ phân giải chất khô lá cây này là 77%.

1.6.4. Lá keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*)

Keo lá tràm hay tràm bông vàng có tên khoa học là *Acacia auriculiformis* là một loài cây thuộc chi Keo (*Acacia*). Đây là cây thuộc họ Đậu, ở rễ có nốt sần ký sinh chứa vi khuẩn nốt rễ có tác dụng tổng hợp đạm tự do, cải tạo môi trường đất, chống xói mòn và rừng phòng hộ nên thường được dùng nhiều trong cải tạo đất sản xuất lâm nghiệp. Cây này phân bố tự nhiên ở vùng Indonesia và Papua New Guinea. Hiện tại được trồng rộng rãi tại nhiều quốc gia ở vùng nhiệt đới trong đó có Việt Nam.

Cây thường xanh cao 15–30 m. Lá dài 10–16 cm, rộng 1,5-2,5 cm. Không sử dụng phổ biến làm cây thức ăn. Ở Ấn Độ sử dụng cây 1 năm tuổi làm thức ăn cho bò. Trong thân, lá có nhiều tanin.

1.6.5. Lá cây keo dậu (*Leucaena leucocephala*)

Cây keo dậu có tên khoa học là *Leucaena leucocephala*. Cây keo dậu có sản lượng lá tương đương với khoảng 2-20 tấn khối lượng khô/ha/năm và củi khoảng 30 – 40m³/ha/năm, sản lượng có thể gấp đôi ở những khu vực có

khí hậu thích hợp. Nó cũng là loài cây rất hiệu quả trong việc cố định đạm, với khối lượng lớn hơn 500kg/ha mỗi năm.

Vào những năm 70 và đầu những năm 80, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucaena) được coi là cây thần kỳ vì đã được trồng thành công ở nhiều nước trên thế giới, là cây có giá trị dinh dưỡng cao, sử dụng được cho nhiều mục đích. Ước tính diện tích trên thế giới của keo dậu vào những năm 1990 là 2-5 triệu ha (Brewbaker và Sorensson, 1990). *Leucaena* có nguồn gốc từ Trung Mỹ và giá trị như một cây thức ăn đã được biết đến trên 400 năm trước bởi những người đi xâm lược Tây Ban Nha (Brewbaker và cs., 1985). Cây này được đưa vào Australia cuối thế kỷ 19 và đã trở thành cây tự nhiên ở đây vào năm 1920 (White, 1937). *Leucaena* đã được biết là có giá trị dinh dưỡng cao tương đương cỏ Alfalfa. Tuy nhiên Na (Natri) và I (Iốt) của cây thấp, cây có nhiều tanin trong lá và cọng (Jones, 1979). Trong lá và cọng có độc tố là mimosin (Jones, 1979). Năng suất gia súc cho ăn bổ sung keo dậu khá cao (Jones và Jones 1984, Davison, 1987).

1.6.6. Ngọn lá sắn (*Manihot esculenta* Crantz leaves)

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một loại cây trồng nhiệt đới được trồng rộng rãi ở Việt Nam, có tiềm năng lớn trong cung cấp nguồn tinh bột cho cả người và vật nuôi. Ngọn lá sắn là phụ phẩm sau thu hoạch có thể dùng làm thức ăn bổ sung như một nguồn protein cho vật nuôi thông qua ủ chua hoặc phơi khô làm thức ăn. Chất lượng của ngọn lá sắn biến động theo từng giống và thời gian thu hoạch, ví dụ, như hàm lượng Protein thô và tanin dao động tương ứng từ 19 - 23% và 3,14 - 4,26% vật chất khô (Khang và Wikstonson, 2000; Man và Wiktorson, 2001; 2002; Arvidsson và Sandberg, 2003).

CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG, THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Bò lai Sind mô phỏng đặt canul và bò lai Sind giai đoạn sinh trưởng.
- Sáu loài cây thức ăn chứa tanin bao gồm: Ngọn lá cây keo dậu (*Leucaena leucocephala*), ngọn lá cây keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*), ngọn lá cây keo tai tượng (*Acacia mangium*), lá chè (*Camellia sinensis*), ngọn lá sắn (*Manihot esculenta* Crantz), lá chè đại (*Trichanthera gigantea*).
- Tanin tinh khiết.

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn Dinh dưỡng và Thức ăn chăn nuôi, Trung tâm thực nghiệm và bảo tồn vật nuôi, (Viện Chăn nuôi). Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt nam)

2.1.3. Thời gian nghiên cứu: từ 2013 đến 2019

2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.2.1. Xác định thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin cho gia súc nhai lại

Mục đích: xác định được thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng, đặc biệt là hàm lượng tanin của ngọn lá cây keo dậu, ngọn lá sắn, ngọn lá cây keo lá tràm, ngọn lá cây keo tai tượng, lá chè và chè đại để bổ sung vào khẩu phần cho bò lai hướng thịt.

2.2.2. Xác định ảnh hưởng của nguồn và mức bổ sung một số loại ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào chất nền đến tốc độ và đặc điểm sinh khí *in vitro*, lượng mêtan sản sinh, tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, giá trị năng lượng ME và lượng axit béo mạch ngắn

Mục đích: xác định cây thức ăn chứa tanin nào tốt nhất, hợp lý nhất để bổ sung vào khẩu phần cho bò lai hướng thịt.

2.2.3. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào khẩu phần đến lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa và tích lũy nitơ ở bò lai Sind sinh trưởng

Mục đích: xác định mức bổ sung thích hợp ngọn lá cây thức ăn chứa tanin đã chọn ở nội dung 2.2.2 vào khẩu phần làm giảm lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa và tích lũy nitơ tốt ở bò lai Sind sinh trưởng.

2.2.4. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin bổ sung vào khẩu phần đến phát thải mêtan, tăng khối lượng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn của bò lai Sind sinh trưởng

Mục đích: xác định mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin đã chọn bổ sung vào khẩu phần cho phát thải khí mêtan thấp nhất, tăng khối lượng cao nhất, hiệu quả chuyển hóa thức ăn tốt nhất của bò lai Sind sinh trưởng để xây dựng khẩu phần trong sản xuất.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Xác định thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin cho gia súc nhai lại

Vật liệu nghiên cứu và chuẩn bị thí nghiệm

Sáu (6) loại cây thức ăn có hàm lượng tanin cao được thu thập tại các nông hộ ở huyện Ba Vì – Hà Nội bao gồm:

- Ngọn lá cây keo dậu (*Leucaena leucocephala*)
- Ngọn lá cây keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*)
- Ngọn lá cây keo tai tượng (*Acacia mangium*)
- Lá chè (*Camellia sinensis*)
- Ngọn lá sắn (*Manihot esculenta* Crantz)
- Lá chè đại (*Trichanthera gigantea*)

Mỗi mẫu sẽ được lấy tại 5 vị trí khác nhau trên cùng nơi trồng sau đó chặt nhỏ (2-3 cm) và trộn đều và mỗi loại lấy khoảng 2 kg tươi làm mẫu đại diện. Tất cả các mẫu đại diện sẽ được cân và chia làm hai phần sấy tại 45⁰C trong 3 ngày. Sau 3 ngày sấy một phần được lấy ra cân và nghiền nhỏ qua mắt sàng 1mm. Phần còn lại tiếp tục sấy ở 105⁰C trong 2 ngày để xác định vật chất khô của từng loại thức ăn. Phần nghiền nhỏ sẽ được chia làm hai, một phần đem phân tích thành phần hóa học, phần còn lại đưa vào làm thí nghiệm *in vitro* gas production.

- Phân tích thành phần hóa học của mẫu: Tất cả các loại cây thức ăn giàu tanin được phân tích các chỉ tiêu: Vật chất khô (Dry matter-DM); protein thô (Crude Protein-CP); mỡ (Crude fat-EE); xơ thô (Crude fiber-CF) và khoáng tổng số (Ash) theo các tiêu chuẩn TCVN 4326-2007, TCVN 4328-2007, TCVN 4321-2007, TCVN 4329-2007, TCVN 4327-2007, riêng NDF, ADF được xác định theo phương pháp của Goering và Van Soest (1970). Tất cả các chỉ tiêu phân tích được tiến hành tại Phòng phân tích thức ăn và sản phẩm chăn nuôi, Viện chăn nuôi. Tanin tổng số (thể hiện bằng % vật chất khô) được phân tích theo phương pháp của AOAC (1975) tại phòng phân tích hữu cơ và nghiên cứu cấu trúc – Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt nam).

- Thí nghiệm *in vitro* gas production: tiến hành theo thủ tục của Menke và Steingass (1988) (xem Phụ lục trang 152). Dịch dạ cỏ được lấy từ hai bò

mỏ lỗ dò giống lai Sind ăn khẩu phần thức ăn (cỏ voi, bột đậu tương, bột sắn, bột ngô, cám gạo) theo tiêu chuẩn NRC (1996) (10-11 MJ/kgVCK và 12-14% protein thô trong khẩu phần) nuôi cùng điều kiện, trước khi cho ăn sáng để đảm bảo thành phần vi sinh vật và hoạt lực enzym của vi sinh vật trong dạ cỏ tương đối ổn định.

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xác định

- *Động thái lên men*: Tổng lượng khí sản sinh ở thời điểm 0; 3; 6; 12; 24; 48; 72 và 96 giờ sau khi bắt đầu ủ được ghi chép để xác định động thái lên men của từng loại ngọn lá cây thức ăn có hàm lượng tanin cao .

- *Tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (OMD) và giá trị năng lượng trao đổi (ME)*: Dựa vào lượng khí sinh ra tại thời điểm 24 giờ sau khi ủ, kết hợp với thành phần hóa học của từng loại ngọn lá cây thức ăn để ước tính tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (OMD) và giá trị năng lượng trao đổi (ME) cho gia súc nhai lại của chúng theo các phương trình của Menke và Steingass (1988):

$$OMD (\%) = 14,88 + 0,889*GP_{24} + 0,45*CP + Ash$$

$$ME (MJ/kg DM) = 2,20 + 0,136*GP_{24} + 0,057*CP + 0,0029*CP^2$$

Trong đó: GP_{24} (ml) là thể tích khí trong xilanh chứa mẫu tại thời điểm 24 giờ sau ủ, CP (%) là tỷ lệ protein thô, Ash (%) là tỷ lệ khoáng tổng số của mẫu.

- *Nồng độ khí methane*: Tổng lượng khí sinh ra trong mỗi xi lanh sau khi ủ mẫu 96 giờ sẽ được thu vào lọ thủy tinh đã hút chân không riêng biệt và phân tích bằng phương pháp đo sắc phổ khí để xác định lượng khí mêtan có trong hỗn hợp khí bằng máy 17A Shimadzu (Shimadzu Corp., Japan). Hàm lượng mêtan trong hỗn hợp khí sinh ra trong quá trình lên men sẽ được tính theo công thức của Jayanegara và cộng sự (2009):

$$Nồng độ methane = \frac{\text{Thể tích thực khí methane}}{\text{Thể tích thực của hỗn hợp khí có trong xilanh}} \times 100$$

Trong đó: thể tích khí thực của mêtan và thể tích thực của hỗn hợp khí tạo ra do vi sinh vật dạ cỏ lên men thức ăn có trong xi lanh được tính toán từ sự chênh lệch của xilanh thí nghiệm và blank tương ứng.

Xử lý số liệu

Kết quả thu được từ các chỉ tiêu được xử lý thống kê mô tả trên phần mềm Excel để có được các thông số thống kê đại diện chung cho từng chỉ tiêu của mỗi loại ngọn lá cây thức ăn.

2.3.2. Xác định ảnh hưởng của nguồn và mức bổ sung một số loại ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào chất nền đến tốc độ và đặc điểm sinh khí *in vitro*, lượng mêtan sản sinh, tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, giá trị năng lượng ME và lượng axit béo mạch ngắn

Nguyên liệu thức ăn và chuẩn bị thí nghiệm

a/ Khẩu phần ăn cơ sở - chất nền

Bảng 2.1. Thành phần và tỷ lệ của khẩu phần cơ sở - chất nền

Nguyên liệu	Tỷ lệ (% VCK)
1. Cỏ voi	89
2. Bột sắn	1,8
3. Đậu tương	3,9
4. Cám ngô	2,5
5. Cám gạo	2,8
<u>Thành phần dinh dưỡng</u>	
VCK	25,2
Protein thô	13
ME	10,3 (MJ/kg)

Khẩu phần cơ sở được xây dựng theo dạng hỗn hợp hoàn chỉnh, có mật độ dinh dưỡng đáp ứng nhu cầu cho bò sinh trưởng theo tiêu chuẩn NRC

(1996) (10-11 MJ/kgVCK và 12-14% protein thô) và được phối trộn tại Bộ môn Dinh dưỡng và Thức ăn chăn nuôi (Viện Chăn nuôi).

Nguyên liệu dùng để xây dựng khẩu phần cơ sở là các nguồn thức ăn sẵn có (cỏ voi, đậu tương, bột sắn, cám ngô, cám gạo) thường dùng trong các cơ sở chăn nuôi (Bảng 2.1).

b/ Phối trộn thức ăn

Thí nghiệm được thiết kế phân lô hoàn toàn ngẫu nhiên. Sáu (6) loài cây thức ăn có hàm lượng tanin cao bao gồm ngọn lá cây keo dậu (*Leucaena leucocephala*), ngọn lá cây keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*), ngọn lá cây keo tai tượng (*Acacia mangium*), lá chè (*Camellia sinensis*), ngọn lá sắn (*Manihot esculenta* Crantz), chè đại (*Trichanthera gigantea*) và tanin tinh khiết được sử dụng trong nội dung này như một loại thức ăn bổ sung vào khẩu phần.

Bảng 2.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

Tanin tổng số/VCK khẩu phần	Khẩu phần thí nghiệm						
	Keo dậu (KD)	Lá sắn (LS)	Chè đại (CĐ)	Lá chè (LC)	Lá keo tai tượng (KTT)	Lá keo lá tràm (KLT)	Tanin (TN)
ĐC: 0,0%							
0,1%	KD1	LS1	CD1	LC1	KTT 1	KLT 1	TN1
0,2%	KD2	LS2	CD2	LC 2	KTT 2	KLT 2	TN2
0,3%	KD3	LS3	CD3	LC 3	KTT 3	KLT 3	TN3
0,4%	KD4	LS4	CD4	LC 4	KTT 4	KLT 4	TN4
0,5%	KD5	LS5	CD5	LC 5	KTT 5	KLT 5	TN5
0,6%	KD6	LS6	CD6	LC 6	KTT 6	KLT 6	TN6

Từng loại ngọn lá cây giàu tanin hoặc tanin tinh khiết được bổ sung vào khẩu phần cơ sở với các tỷ lệ khác nhau: 0% (đối chứng), 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6% tính theo phần trăm (%) tanin tổng số/vật chất khô. Mẫu

phối trộn này được gọi là chất nền. Như vậy sẽ có 43 chất nền (1 mẫu đối chứng và 7 loại thức ăn $\times$ 6 tỷ lệ phối trộn). Sau khi phối trộn tất cả các mẫu này sẽ được chia làm hai một phần đem phân tích thành phần hóa học, phần còn lại đưa vào làm thí nghiệm *in vitro* gas production. Đây là thí nghiệm hai nhân tố bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn. Hai nhân tố thí nghiệm là nguồn tanin và tỷ lệ bổ sung tanin khác nhau vào khẩu phần như Bảng 2.2.

c/ Tiến hành thí nghiệm *in vitro* gas production

Thí nghiệm *in vitro* gas production được tiến hành theo thủ tục của Menke và Steingass (1988) (xem Phụ lục trang 152). Dịch dạ cỏ được lấy từ hai bò đực mô phỏng giống lai Sind ăn khẩu phần thức ăn (cỏ voi, bột đậu tương, bột sắn, bột ngô, cám gạo) theo tiêu chuẩn NRC (1996) (10-11 MJ/kgVCK và 12-14% protein thô trong khẩu phần) nuôi cùng điều kiện, trước khi cho ăn buổi sáng để đảm bảo thành phần vi sinh vật và hoạt lực enzym của vi sinh vật trong dạ cỏ tương đối ổn định.

d/ Xác định thành phần hóa học của thức ăn

Vật chất khô (Dry matter-DM); protein thô (Crude Protein-CP); mỡ (Crude fat-EE); xơ thô (Crude fiber-CF) và khoáng tổng số (Ash) theo các tiêu chuẩn TCVN 4326-2007, TCVN 4328-2007, TCVN 4321-2007, TCVN 4329-2007, TCVN 4327-2007, riêng NDF, ADF được xác định theo phương pháp của Goering và Van Soest (1970). Tất cả các chỉ tiêu phân tích được tiến hành tại Phòng phân tích thức ăn và sản phẩm chăn nuôi – Viện chăn nuôi. Tanin tổng số (thể hiện bằng % vật chất khô) được phân tích theo phương pháp của AOAC (1975) tại phòng phân tích hữu cơ và nghiên cứu cấu trúc – Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam).

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xác định

– *Tốc độ và đặc điểm sinh khí lên men in vitro*

- Tổng lượng khí sản sinh của các khẩu phần ở các thời điểm 0; 3; 6; 12; 24; 48; 72 và 96 giờ sau khi ủ được ghi chép cho từng xylanh. Lượng khí tích lũy trong quá trình lên men *in vitro* được tính như sau:

$$\text{Khí tích lũy (ml)} = \text{Lượng khí sinh ra tại thời điểm } t \text{ (ml)} - \text{Giá trị trung bình lượng khí sinh ra tại thời điểm } t \text{ (ml) của các xi lanh không chứa mẫu (blank)}.$$

- Động thái sinh khí được bằng phần mềm NEWAY của Chen, (1995) để ước tính độ phân giải dạ cỏ và đặc điểm sinh khí, theo phương trình phi tuyến tính của McDonald (1981):

$$Y = a + b [1 - e^{-c(t-L)}]$$

đối với các loại thức ăn chậm phân giải;

Trong đó: Y là thể tích khí sinh ra ở thời điểm t (ml); a là lượng khí sinh ra từ các chất dễ hoà tan thường ở ngay tại thời điểm ban đầu khi ủ mẫu (ml); b là lượng khí sinh ra từ các chất khó hoà tan trong suốt quá trình ủ (ml); a + b là tổng lượng khí sinh ra của khẩu phần đem ủ hay tiềm năng sinh khí của khẩu phần thức ăn đó (ml); c là tốc độ sinh khí (%/giờ); t là thời gian ủ mẫu khẩu phần thức ăn thí nghiệm (giờ) và L là thời gian từ lúc ủ đến lúc bắt đầu sản sinh khí.

– *Tỷ lệ tiêu hóa chất khô (DMD) và chất hữu cơ (OMD) in vitro của khẩu phần*

Tiêu hóa chất khô và tiêu hóa chất hữu cơ *in vitro* sẽ được xác định ở 48 giờ sau khi lên men, xả khí. Sau khi xả khí, mẫu trong các xylanh được lọc bằng giấy thấm Whatman số 4. Mẫu sau khi lọc đưa vào các cốc sứ (đã xác định khối lượng) và sấy ở 105⁰C trong 24 giờ để xác định tỷ lệ tiêu hóa vật

chất khô *in vitro*. Sau đó mẫu được đốt tại buồng đốt ở nhiệt độ 550⁰C trong 4 giờ để xác định tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ *in vitro*.

– *Giá trị năng lượng trao đổi (ME)*

Dựa vào lượng khí sinh ra tại thời điểm 24 giờ sau khi ủ, kết hợp với thành phần hóa học của từng khẩu phần thí nghiệm để ước tính giá trị năng lượng trao đổi của khẩu phần sử dụng các phương trình của Menke và Steingass (1979; 1988):

$$ME \text{ (MJ/kg VCK)} = 2,20 + 0,136*GP_{24} + 0,057*CP + 0,0029*CP^2$$

Trong đó: GP₂₄ (ml) là thể tích khí trong xylanh chứa mẫu tại thời điểm 24 giờ sau ủ; CP (%) là tỷ lệ protein thô của khẩu phần thí nghiệm.

– *Hàm lượng axit béo mạch ngắn (SCFA) (mmol/200gVCK)*

Dựa vào khí sinh ra tại thời điểm 24 giờ sau khi ủ để ước tính hàm lượng axit béo mạch ngắn của từng loại khẩu phần sử dụng phương trình của Getachew và cs. (1998):

$$SCFA \text{ (mmol/200gVCK)} = 0,0239*GP_{24} - 0,0601$$

Trong đó: GP₂₄ (ml) là thể tích khí trong xylanh chứa mẫu tại thời điểm 24 giờ sau ủ.

– *Xác định lượng khí mêtan*

Lượng CH₄ sản sinh của từng khẩu phần được xác định theo hai phương pháp sau:

a/ Phương pháp xác định phần trăm thể tích của CH₄ bằng dung dịch NaOH (10M).

Đây là phương pháp của Demeyer và cs. (1988); Fievez và cs. (2005). Phương pháp được tiến hành theo các bước sau:

+ Bước 1: Tại thời điểm ủ 48 giờ lấy xylanh trong tủ ấm 39⁰C ra thu khí

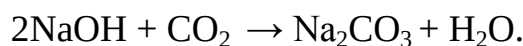
vào xylanh.

+ Bước 2: Chuyển toàn bộ lượng khí thu được vào lọ thủy tinh có dung tích 100 ml.

+ Bước 3: Hút V_1 ml khí từ lọ thủy tinh vào trong xylanh 100 ml.

Chuẩn bị một xylanh 5 ml trong có chứa 4 ml dung dịch NaOH (10M).

+ Bước 4: Bơm từ từ dung dịch NaOH vào xy lanh 100 ml vừa hút mẫu ở bước 3 sau đó lắc đều (1 lần/phút) trong vòng 5 phút, đọc thể tích V_2 sau khi NaOH đã hấp thụ hoàn toàn CO_2 (Demeyer và cs., 1988; Fievez và cs., 2005). Phản ứng hấp thụ của NaOH như sau:



+ Bước 5: Tính kết quả theo công thức sau:

$$\% \text{CO}_2 = \frac{V_1 - (V_2 - 4)}{V_1} \times 100$$

$$\% \text{CH}_4 = 100 - \% \text{CO}_2$$

Số lượng khí mêtan sinh ra từ mỗi khẩu phần chính là: $\% \text{CH}_4 \times \text{tổng lượng khí sinh ra từ mỗi khẩu phần (ml)}$

b/ Phương pháp xác định phần trăm thể tích của CH_4 bằng Gas Chromatography (GC).

Tại thời điểm 48 giờ, khí cũng được thu như phương pháp xác định phần trăm thể tích của CH_4 bằng dung dịch NaOH (10M). Các mẫu khí được phân tích nồng độ khí mêtan tại trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội và bằng phương pháp sắc ký (Gas chromatography - GC bằng máy GC17A Detector FID) theo phương pháp của Van Nevel và cs. (1970).

Tổng lượng khí sinh ra trong mỗi xylanh sau khi ủ mẫu 96 giờ sẽ được thu vào lọ thủy tinh đã hút chân không riêng biệt để đưa đi phân tích. Hàm lượng mêtan trong hỗn hợp khí sinh ra trong quá trình lên men sẽ được tính theo công thức của Jayanegara và cs. (2009) như sau:

$$\text{Nồng độ methane} = \frac{\text{Thể tích thực khí methane}}{\text{Thể tích thực của hỗn hợp khí có trong xilanh}} \times 100$$

Trong đó: thể tích khí thực của mêtan và thể tích thực của hỗn hợp khí tạo ra do vi sinh vật dạ cỏ lên men thức ăn có trong xi lanh được tính toán từ sự chênh lệch của xilanh thí nghiệm và blank (không có mẫu) tương ứng. Thể tích mêtan (V_{CH_4}):

$$V. CH_4 (ml) = \frac{\%CH_4 \times \text{Thể tích thực của hỗn hợp khí có trong xilanh (ml)}}{100}$$

Trong đó: thể tích khí thực của mêtan và thể tích thực của hỗn hợp khí tạo ra do vi sinh vật dạ cỏ lên men thức ăn có trong xylanh được tính toán từ sự chênh lệch của xylanh thí nghiệm và blank tương ứng.

– *Khả năng giảm thiểu sinh khí mêtan của chất nền so với khẩu phần cơ sở (MRP)*: MRP của chất nền được bổ sung cây thức ăn có hàm lượng tanin cao hoặc tanin tinh khiết được tính theo công thức sau:

$$MRP (\%) = \frac{\text{Methane từ đối chứng} - \text{Methane từ chất nền}}{\text{Methane từ đối chứng}} \times 100$$

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thô trên bảng tính Excel và phần mềm NEWAY, sau đó được tiến hành xử lý thống kê bằng thủ tục GLM (General Linear Model) trên SAS (1998).

– Khi phân tích ảnh hưởng của khẩu phần, mô hình có dạng:

$$Y_{ij} = \mu + CT_i + \varepsilon_{ij}$$

Trong đó: Y_{ij} là giá trị quan sát thứ j của yếu tố thí nghiệm i (khẩu phần); μ là trung bình tổng thể; CT_i là ảnh hưởng của khẩu phần thí nghiệm; ε_{ij} là sai số ngẫu nhiên.

– Khi phân tích ảnh hưởng của nguồn tanin mô hình có dạng:

$$Y_{ij} = \mu + NT_i + \varepsilon_{ij}$$

Trong đó: Y_{ij} là giá trị quan sát thứ j của yếu tố thí nghiệm i (nguồn tanin); μ là trung bình tổng thể; NT_i là ảnh hưởng của nguồn tanin; ε_{ij} là sai số ngẫu nhiên.

- Khi phân tích ảnh hưởng của mức tanin mô hình có dạng:

$$Y_{ij} = \mu + MT_i + \varepsilon_{ij}$$

Trong đó: Y_{ij} là giá trị quan sát thứ j của yếu tố thí nghiệm i (mức tanin); μ là trung bình tổng thể; MT_i là ảnh hưởng của mức tanin; ε_{ij} là sai số ngẫu nhiên.

So sánh đa chiều các giá trị trung bình bằng Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (Steel và Torrie, 1980).

2.3.3. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin vào khẩu phần đến lượng mêtan phát thải, tỷ lệ tiêu hóa và tích lũy nitơ ở bò lai Sind sinh trưởng

Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm tiến hành tại Trung tâm Thực nghiệm và Bảo tồn vật nuôi, Viện Chăn nuôi trong tháng 8/2017.

Gia súc, khẩu phần thức ăn và thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trên 4 bò đực lai Sind sinh trưởng, khối lượng trung bình 160 kg/con. Bò được nuôi nhốt cá thể, thức ăn *ad libitum* và nước uống tự do. Bò được tẩy giun sán trước khi thí nghiệm. Mỗi giai đoạn thí nghiệm kéo dài 15 ngày; trong đó 7 ngày nuôi thích nghi với khẩu phần ăn sau đó lấy mẫu liên tục trong 7 ngày (Bảng 2.3).

Bảng 2.3. Tỷ lệ các nguyên liệu thức ăn và giá trị dinh dưỡng của khẩu phần thí nghiệm in vivo (% VCK)

Nguyên liệu	KP1	KP2	KP3	KP4
Rơm lúa chiêm (%)	42,4	40,2	41,1	35,9
Cỏ voi ủ (%)	13,6	10,7	10,3	10,3
Ngô hạt (%)	16,1	9,6	6,7	6,7
Cám gạo (%)	20,8	14,3	10,5	10,5
Rỉ mật (%)	5,2	5,3	5,3	5,3
Ngọn lá keo dậu khô (%)		19,1	25,9	31,5
Urê (%)	1,9	0,9	0,3	
Khoáng (tăng liếm)	Tự do	Tự do	Tự do	Tự do
Năng lượng trao đổi ME (MJ/kg DM)	9,5	9,9	10,1	10,3
Protein thô (g/kg VCK)	145,3	154,1	148,9	154,4
Tỷ lệ vật chất khô (%)	61,6	66,5	67,5	67,7

Chú thích: KP1: Đối chứng - 0 % lá keo dậu khô; KP2: 19,1 % lá keo dậu khô tương đương 0,3 % tanin; KP3: 25,9 % lá keo dậu khô tương đương 0,4% tanin; KP4: 31,5 % lá keo dậu khô tương đương 0,5% tanin.

Thí nghiệm thiết kế theo kiểu ô vuông Latin theo sơ đồ như Bảng 2.4.

Bảng 2.4. Sơ đồ thí nghiệm in vivo

Giai đoạn	Số hiệu bò			
	A	B	C	D
1	KP1	KP2	KP3	KP4
2	KP2	KP1	KP4	KP3
3	KP3	KP4	KP1	KP2
4	KP4	KP3	KP2	KP1

Thức ăn và cách cho ăn

- Rơm được phay nhỏ (5-7 cm) bằng máy phay sau đó trộn với cỏ voi ủ.

- Các nguyên liệu: ngô hạt, cám gạo, bột ngọn lá keo đậu khô, rỉ mật và urê được trộn thành hỗn hợp sau đó trộn chúng với rom và cỏ voi ủ trước khi cho ăn
- Bò thí nghiệm được cho ăn ngày 2 lần vào 8 giờ sáng và 4 giờ chiều.

Phân tích thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của thức ăn

Thành phần hóa học khẩu phần được phân tích: chất khô (Dry matter-DM); protein thô (Crude Protein-CP); mỡ (Crude fat-EE); xơ thô (Crude fiber-CF) và khoáng tổng số (Ash) theo các tiêu chuẩn TCVN 4326-2007, TCVN 4328-2007, TCVN 4321-2007, TCVN 4329-2007, TCVN 4327-2007, riêng NDF, ADF được xác định theo phương pháp của Goering và Van Soest (1970). Tất cả các chỉ tiêu phân tích được tiến hành tại Phòng phân tích thức ăn và sản phẩm chăn nuôi – Viện Chăn nuôi.

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp tính

- *Lượng thức ăn thu nhận*: Thức ăn cho ăn và thức ăn thừa hàng ngày của từng các thể bò được cân và ghi chép hàng ngày cho từng các thể ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm để tính lượng thức ăn ăn vào, lượng năng lượng ăn vào.

- *Lượng khí mêtan sản sinh*: Việc xác định tổng khí mêtan sản sinh (L/con/ngày) được xác định thông qua hệ thống phân tích khí mêtan gắn với buồng hô hấp tại Trung tâm Thực nghiệm và Bảo tồn vật nuôi, Viện Chăn nuôi. Mỗi con bò được đưa vào buồng hô hấp 1 ngày để xác định tổng lượng khí mêtan sản sinh.

- *Tỷ lệ tiêu hóa in vivo của khẩu phần*: Được xác định liên tục trong 7 ngày. Trong giai đoạn này, các nguyên liệu thức ăn tinh, thức ăn thô cho ăn và thức ăn thừa, phân và nước tiểu của từng cá thể được lấy mẫu hàng ngày và bảo quản trong tủ lạnh. Đến cuối kỳ thu phân và nước tiểu, các mẫu của từng loại thức ăn được trộn đều là một mẫu đại diện được lấy, gửi đi phân tích xác

định thành phần hóa học và ước tính tỷ lệ tiêu hóa. Tỷ lệ tiêu hóa của các chất dinh dưỡng được tính từ lượng chất dinh dưỡng ăn vào và lượng thải ra trong phân tính theo phần trăm so với lượng ăn vào theo phương pháp của Cochran và Galyean (1994), Burns và Pond (1994).

$$\% \text{Tiêu hóa VCK} = \frac{K. \text{lượng VCK ăn vào} - K. \text{lượng VCK phân}}{K. \text{lượng VCK ăn vào}} \times 100$$

$$\% \text{Tiêu hóa protein} = \frac{K. \text{lượng protein ăn vào} - K. \text{lượng protein phân}}{K. \text{lượng protein ăn vào}} \times 100$$

$$\% \text{Tiêu hóa mỡ} = \frac{K. \text{lượng mỡ ăn vào} - K. \text{lượng mỡ phân}}{K. \text{lượng mỡ ăn vào}} \times 100$$

$$\% \text{Tiêu hóa xơ} = \frac{K. \text{lượng xơ ăn vào} - K. \text{lượng xơ phân}}{K. \text{lượng xơ ăn vào}} \times 100$$

$$\% \text{Tiêu hóa NDF} = \frac{K. \text{lượng NDF ăn vào} - K. \text{lượng NDF phân}}{K. \text{lượng NDF ăn vào}} \times 100$$

$$\% \text{Tiêu hóa ADF} = \frac{K. \text{lượng ADF ăn vào} - K. \text{lượng ADF phân}}{K. \text{lượng ADF ăn vào}} \times 100$$

$$\% \text{Tiêu hóa CHC} = \frac{K. \text{lượng CHC ăn vào} - K. \text{lượng CHC phân}}{K. \text{lượng CHC ăn vào}} \times 100$$

- *Lượng nitơ tích lũy*: được tính theo công thức:

$$Ni \text{ tơ tích lũy} = \frac{Ni \text{ tơ thu nhận} - (Ni \text{ tơ phân} + Ni \text{ tơ nước tiểu})}{Ni \text{ tơ thu nhận}} \times 100$$

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm Minitab 14.0. Mô hình ANOVA tổng quát để phân tích số liệu là mô hình sau:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ijk} + (\alpha\beta)_{ij}$$

Trong đó:

X_{ijk} : giá trị quan sát k của yếu tố thí nghiệm i (bò) và j (giai đoạn thí nghiệm),

μ : trung bình tổng thể,

α_i : ảnh hưởng của yếu tố thí nghiệm i ,

β_j : ảnh hưởng của yếu tố thí nghiệm j ,

e_{ijk} : sai số ngẫu nhiên,

$(\alpha\beta)_{ij}$: tương tác của yếu tố i và j .

Nếu ANOVA cho thấy có sự sai khác thì phương pháp so sánh cặp số trung bình Tukey sẽ được áp dụng để xác định sai khác giữa các nghiệm thức.

2.3.4. Xác định ảnh hưởng của mức bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin bổ sung vào khẩu phần đến phát thải mêtan, tăng khối lượng và hiệu quả chuyển hóa thức ăn của bò lai Sind sinh trưởng

Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm tiến hành tại Trung tâm Thực nghiệm và Bảo tồn vật nuôi, Viện Chăn nuôi tháng 6/2018.

Thức ăn bổ sung, gia súc và thiết kế thí nghiệm

Bột lá keo dậu

Lá keo dậu được thu mua sau đó phơi khô nghiền thành bột dùng bổ sung vào khẩu phần nuôi bò thí nghiệm. Mẫu bột lá keo dậu khô được phân tích thành phần hóa học gồm chất khô (Dry matter-DM); protein thô (Crude Protein-CP); mỡ (Crude fat-EE); xơ thô (Crude fiber-CF) và khoáng tổng số (Ash) theo tiêu chuẩn TCVN 4326-2007, TCVN 4328-2007, TCVN 4321-2007, TCVN 4329-2007, TCVN 4327-2007 tại Phòng phân tích thức ăn và sản phẩm chăn nuôi (Viện Chăn nuôi), riêng tanin tổng số được phân tích theo phương pháp của AOAC (1975) tại phòng phân tích hữu cơ và nghiên cứu cấu trúc – Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam. Kết quả phân tích bột lá keo dậu như sau: Vật chất khô: 95,39%; Protein thô: 27,85%; Lipit: 6,69%; Xơ thô: 15,81%; Ash: 8,11%; Tanin: 14,38 (g/kg VCK).

Gia súc và bố trí thí nghiệm

Hai mươi (20) bò đực giống lai Sind sinh trưởng ở giai đoạn 15 – 18 tháng tuổi, khối lượng trung bình 157 - 159 kg được sử dụng trong thí nghiệm này. Bò được bố trí nuôi 4 khẩu phần được bổ sung tannin từ keo đậu ở các mức khác nhau. Thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn (Complete randomized design - CRD). Sơ đồ thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 2.5.

Bảng 2.5: Sơ đồ bố trí thí nghiệm nuôi dưỡng

Chỉ tiêu	KP1	KP2	KP3	KP4
Số gia súc (con)	5	5	5	5
Khối lượng (kg)	157,1 ± 5,2	157,7 ± 6,9	157,2 ± 4,9	158,9 ± 3,5
Nuôi chuẩn bị (ngày)	15	15	15	15
Nuôi thí nghiệm (ngày)	84	84	84	84
Nước uống	Tự do	Tự do	Tự do	Tự do

Bò được nuôi nhốt cá thể, tẩy giun sán và được nuôi chuẩn bị trong 15 ngày trước khi bước vào giai đoạn thí nghiệm. Kiểm soát lượng thức ăn ăn vào.

Thí nghiệm sẽ được theo dõi liên tục 84 ngày. Trước khi vào thí nghiệm bò được nuôi thích nghi 15 ngày trong mỗi ô chuồng riêng biệt. Khối lượng gia súc được cân hàng tháng để điều chỉnh khẩu phần ăn phù hợp với nhu cầu của bò. Hàng tháng, mỗi con bò được đưa vào buồng hô hấp 1 ngày để xác định tổng lượng khí methane sản sinh.

Khẩu phần và cách cho ăn

Khẩu phần được xây dựng theo tiêu chuẩn của Kearn (1982) cho bò thịt sinh trưởng ở mức tăng khối lượng từ 0,5 đến 0,7 kg/con/ngày. Các khẩu phần thí nghiệm gồm: (1) KP1 (đối chứng): không bổ sung lá keo dậu khô; (2) KP2: bổ sung 0,3% tannin từ keo dậu tương đương 19,1% lá keo dậu khô; (3) KP3: bổ sung 0,4% tannin từ keo dậu tương đương 25,9% lá keo dậu khô và (4) KP4: bổ sung 0,5% tannin từ keo dậu tương đương 31,5% lá keo dậu khô. Với khẩu phần này, giá trị năng lượng trao đổi và protein thô trong các khẩu phần là như nhau (Bảng 2.6).

Bảng 2.6. Tỷ lệ các nguyên liệu thức ăn và giá trị dinh dưỡng của khẩu phần thí nghiệm (% VCK)

Nguyên liệu	KP1 (ĐC)	KP2	KP3	KP4
Ngô hạt (%)	16,1	9,6	6,7	6,7
Rơm lúa chiêm (%)	42,4	40,2	41,1	35,9
Cám gạo (%)	20,8	14,3	10,5	10,5
Cỏ voi ủ (%)	13,6	10,7	10,3	10,3
Rỉ mật (%)	5,2	5,3	5,3	5,3
Ngọn lá keo dậu khô (%)	-	19,1	25,9	31,5
Urê (%)	1,9	0,9	0,3	-
Khoáng (tăng liếm)	Tự do	Tự do	Tự do	Tự do
Năng lượng ME (MJ/kg DM)	9,5	9,9	10,1	10,3
Protein thô (g/kg VCK)	145,3	154,1	148,9	154,4
Tỷ lệ vật chất khô (%)	61,6	66,5	67,5	67,7

Chú thích: KP1: Đối chứng - 0 % lá keo dậu khô; KP2: 19,1 % lá keo dậu khô tương đương 0,3 % tanin; KP3: 25,9 % lá keo dậu khô tương đương 0,4% tanin; KP4: 31,5 % lá keo dậu khô tương đương 0,5% tanin..

Bò thí nghiệm được cho ăn ngày 2 lần và buổi sáng lúc 8 giờ và buổi chiều lúc 16 giờ. Các thức ăn tinh được trộn thành hỗn hợp trước rồi trộn với rơm đã phay nhỏ (5-7 cm) bằng máy phay cỏ và cỏ voi ủ trước khi cho ăn.

Phân tích thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của thức ăn

Thành phần hóa học khẩu phần được phân tích: chất khô (Dry matter-DM); protein thô (Crude Protein-CP); mỡ (Crude fat-EE); xơ thô (Crude fiber-CF) và khoáng tổng số (Ash) theo tiêu chuẩn TCVN 4326-2007, TCVN 4328-2007, TCVN 4321-2007, TCVN 4329-2007, TCVN 4327-2007, riêng NDF, ADF được xác định theo phương pháp của Goering và Van Soest (1970). Các chỉ tiêu được phân tích tại Phòng phân tích thức ăn và sản phẩm chăn nuôi, Viện Chăn nuôi.

Giá trị năng lượng trao đổi của khẩu phần

Giá trị năng lượng trao đổi (ME) của khẩu phần được xác định bằng phương pháp *in vitro* gas production của Menke và Steingass (1988). Trên cơ sở khí tích lũy (ml) sau 24 giờ ủ thức ăn với dịch dạ cỏ (GP₂₄) và thành phần hóa học đã phân tích, ME được tính theo công thức dưới đây:

$$ME \text{ (kcal/kg DM)} = 1885 + 21 * GP_{24} + 2.49 * DM - 21.6 * CP \text{ (Đinh Văn Mươi, 2012)}$$

Ở đây: GP₂₄ là lượng khí tích lũy (ml) sau khi ủ thức ăn 24 giờ; DM là % chất khô của thức ăn; CP là % protein thô của thức ăn.

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp tính

- *Lượng thức ăn thu nhận*: Thức ăn cho ăn và thức ăn thừa hàng ngày của từng các thể bò được cân và ghi chép hàng ngày cho từng các thể ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm để tính lượng thức ăn ăn vào.

- *Khối lượng tích lũy*: được xác định bằng cách cân khối lượng 4 tuần/lần vào buổi sáng trước khi cho ăn bằng cân điện tử RudWeight (Úc).

- *Tăng khối lượng tuyệt đối*: được xác định bằng công thức:

$$A \text{ (g/ngày)} = \frac{P_2 - P_1}{T_2 - T_1}$$

Trong đó: P_2 Khối lượng cân tại thời điểm T_2 (kg); P_1 Khối lượng cân tại thời điểm T_1 (kg); T_1, T_2 thời gian nuôi dưỡng tương ứng với P_1, P_2

- *Tăng khối lượng tương đối*: được xác định bằng công thức:

$$R^2(\%) = \frac{P_2 - P_1}{(P_2 + P_1)/2} \times 100$$

Trong đó: $R\%$: Tốc độ tăng trưởng (%); P_1 : Khối lượng cân tại thời điểm T_1 (kg); P_2 : Khối lượng cân tại thời điểm T_2 (kg).

- *Tiêu tốn thức ăn cho tăng khối lượng*: được tính toán từ số liệu ghi chép thức ăn thu nhận và tăng khối lượng của bò thí nghiệm.

- *Lượng khí mêtan sản sinh*: được xác định thông qua hệ thống phân tích khí mêtan gắn với buồng hô hấp tại Trung tâm Thực nghiệm và Bảo tồn vật nuôi, Viện Chăn nuôi. Mỗi con bò được đưa vào buồng hô hấp 1 ngày để xác định tổng lượng khí mêtan sản sinh.

- *Lượng khí mêtan sản sinh trên mỗi kg tăng khối lượng (MPG)*: Để xác định được mỗi kg tăng khối lượng bò sản sinh bao nhiêu khí mêtan khi ăn khẩu phần nhất định được tính theo công thức sau:

$$MPG \left(\frac{l}{kg} \text{ tăng trọng} \right) = \frac{\text{Tổng lượng khí mêtan sản sinh hàng ngày}}{\text{Tăng khối lượng hàng ngày của bò}}$$

- *Khả năng giảm thiểu khí mêtan sản sinh trên mỗi kg tăng khối lượng (MRPG)* của khẩu phần được bổ sung cây thức ăn có hàm lượng tanin cao so với khẩu phần đối chứng sẽ được tính theo công thức sau:

$$MRPG (\%) = \frac{MPG \text{ khẩu phần đối chứng} - MPG \text{ khẩu phần thí nghiệm}}{MPG \text{ khẩu phần đối chứng}} \times 100$$

- *Hiệu quả kinh tế*: tính toán sơ bộ trên cơ sở chi phí đầu vào (tiền mua bò, thức ăn nuôi dưỡng).

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm Minitab 14.0. Mô hình ANOVA tổng quát để phân tích số liệu là mô hình sau:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij};$$

Trong đó: Y_{ij} là biến phụ thuộc, μ là trung bình tổng thể, A_i ảnh hưởng của khẩu phần, ε_{ij} là sai số ngẫu nhiên. Nếu ANOVA cho thấy có sự sai khác thì phương pháp so sánh cặp số trung bình Tukey sẽ được áp dụng để xác định sai khác giữa các nghiệm thức.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG CỦA MỘT SỐ NGỌN LÁ CÂY THỨC ĂN CHỨA TANIN

Kết quả phân tích về thành phần hóa học của các loại lá cây thức ăn chứa tanin được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Thành phần hóa học của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin (% theo VCK)

	VCK (%)	Pro. thô	Lipit	Xơ thô	NDF	ADF	KTS
Keo dậu	22,65	31,19	2,54	18,38	32,60	21,90	7,87
Lá sắn	18,41	26,16	3,81	17,84	33,99	22,85	9,45
Chè đại	12,73	14,33	1,47	14,37	34,69	25,46	8,59
Lá chè	30,15	19,04	2,44	18,17	34,91	21,22	5,66
Keo tai tượng	35,76	15,02	2,93	24,23	43,49	30,64	5,31
Keo lá trà	32,52	16,12	2,34	32,13	52,77	37,8	5,9

Ghi chú: VCK: Vật chất khô, KTS: khoáng tổng số

Bảng 3.1 cho thấy các chỉ tiêu về thành phần hóa học của lá keo dậu như protein thô, lipit thô, xơ thô, NDF, ADF và KTS lần lượt là 31,19; 2,54; 18,38; 32,60; 21,90 và 7,87% vật chất khô. Nhìn chung, một số chỉ tiêu về thành phần hóa học của lá keo dậu trong nghiên cứu này tương đương với các nghiên cứu trước đó (Vũ Chí Cường và cs., 2008; Jayanegara và cs., 2011). Hàm lượng protein thô của lá keo dậu trong nghiên cứu này (31,19%) cao hơn hàm lượng này của lá keo dậu trong nghiên cứu của Vũ Chí Cường và cs. (2008) (27,57%). Tuy nhiên, khi so sánh giá trị của các chỉ tiêu thành phần hóa học trong nghiên cứu này với một số nghiên cứu khác thì chúng đều nằm trong khoảng biến động, cụ thể như sau protein thô: 10,3 -27,8; khoáng tổng số: 8,4 -17,96; NDF 48,1-59,49; ADF 21,3-50,8% (Njiadda và Nasiru.

2010; Babayemi và cs., 2009; Chumpawadee và Pimpa, 2008, Khanum và cs., 2007; Tedonkeng và cs., 2007; Chumpawadee và cs., 2007; Sallam, 2005; Singh và cs., 2005; Nieves và cs., 2004; Promkot và Wanapat, 2003; Smith và cs., 1991). Như vậy, với hàm lượng protein cao, xơ, NDF và ADF không cao thì lá keo đậu thực sự là nguồn thức ăn bổ sung protein có giá trị cho gia súc nhai lại.

Đối với ngọn lá sắn, một số chỉ tiêu về thành phần hóa học của lá sắn trong nghiên cứu này tương đương với nhiều nghiên cứu trước đó của Yves Froehlich và Thai Van Hung, (2001); Wanapat, (2001). Tuy nhiên, hàm lượng protein thô của lá sắn trong nghiên cứu này (26,16%) cao hơn một chút so với kết quả của Wanapat (2001) là 23,4%.

Thành phần hóa học của lá chè đại trong nghiên cứu này về cơ bản cũng tương tự như các kết quả của Pascal Leteme (2005). Mặc dù vậy, nhưng hàm lượng protein thô của lá chè đại trong nghiên cứu của chúng tôi (14,33%) thấp hơn hàm lượng này của lá chè đại (16,6%) trong nghiên cứu của Pascal Leteme (2005).

Về thành phần hóa học của lá chè trong nghiên cứu này cho thấy các chỉ tiêu về thành phần hóa học có giá trị tương đương và nằm trong khoảng biến động của các nghiên cứu trước đây. Ví dụ, hàm lượng protein thô lá chè là 19,04% nằm trong khoảng dao động từ 18,2 đến 30,7% (Chu và Juneja, 1997). Với lá keo tai tượng, keo lá tràm, các chỉ tiêu về thành phần hóa học cũng có giá trị tương đương và nằm trong khoảng biến động của các nghiên cứu các loại cây *Acacia* đã công bố. Theo Aganga và cs. (1998) lá các loại cây *Acacia* có hàm lượng protein thô: 12,6-13,9%. Jayanegara và cs. (2011) thấy lá các loại cây *Acacia* có hàm lượng protein thô: 16,2-31,1%. Theo Abdulrazak và cs. (2000) cho biết: lá các loại cây *Acacia* tại Nigeria có hàm

lượng protein thô dao động từ 13,4 đến 21,3 % VCK; NDF và ADF dao động từ 15,4 đến 30,8 % và 11,4 đến 25,1%. Salem và cs. (1999) nghiên cứu trên 11 loại *Acacia* cho biết, các giá trị của hàm lượng protein thô: 5,0-20,3 %; xơ thô: 8,4-36,6%; khoáng: 4,0–15%. Theo Njiadda và Nasiru (2010) lá *Acacia tortilis* có hàm lượng protein thô, xơ thô, NDF, ADF tương ứng là: 13,96; 30,50; 48,62; 21,16%.

Như vậy, với hàm lượng protein khá cao, xơ, NDF và ADF không quá cao lá chè, lá keo tai tượng, lá keo lá tràm nếu được nghiên cứu kỹ hơn thì chúng có thể là nguồn thức ăn bổ sung protein có giá trị cho gia súc nhai lại.

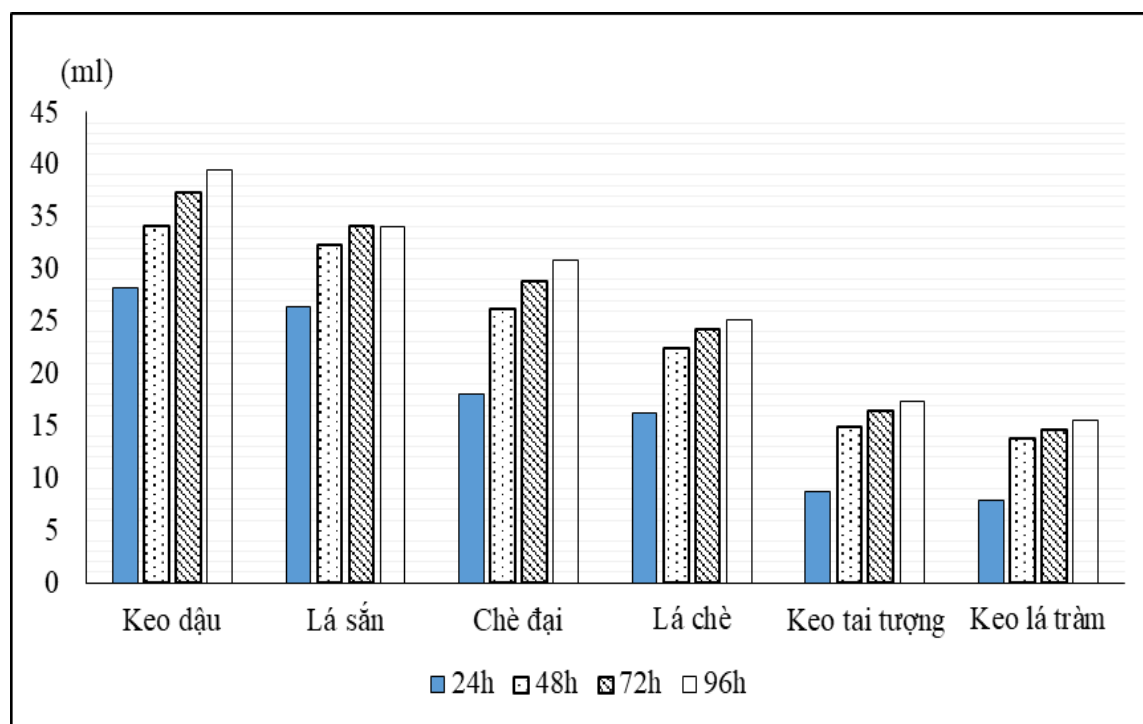
Nhìn chung, so với các kết quả nghiên cứu khác, thành phần hóa học của các thức ăn nghiên cứu ở đây có những sai khác nhất định và khá biến động. Biến động này là đương nhiên, hoàn toàn hợp lý và do rất nhiều nguyên nhân gây ra. Các nguyên nhân quan trọng bao gồm: giống cây, tuổi cắt hay tuổi thu hoạch, giai đoạn sinh trưởng của cây, cỏ, môi trường và quản lý chăm sóc cây, cỏ, mùa vụ, phân bón, nước tưới, phương pháp dự trữ và chế biến làm thức ăn (Zinash và cs., 1995; Daniel, 1996; Mei-Ju Lee và cs., 2000; Tesema và cs., 2002; Adane, 2003; Bayble và cs., 2007).

Ngoài việc xác định thành phần hóa học, 6 loại lá cây cũng được dùng để xác định động thái sinh khí *in vitro* gas production, đồng thời tính toán các giá trị năng lượng trao đổi (ME) cho gia súc nhai lại, tỷ lệ tiêu hóa chất khô (OMD) trên cơ sở khí tích lũy tại thời điểm 24h (G_{24}) và phân tích nồng độ khí mêtan sản sinh ra trong mỗi xi lanh sau 96 giờ ủ mẫu. Kết quả chính được trình bày tóm tắt trong Bảng 3.2; 3.3 và được minh họa qua Hình 3.1; 3.2; 3.3; 3.4 và 3.5.

Bảng 3.2. Tốc độ sinh khí *in vitro* gasproduction, tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (OMD) và giá trị năng lượng (ME) một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin

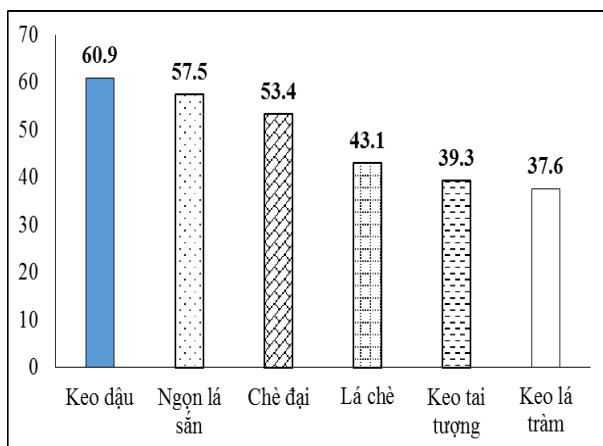
	Tốc độ sinh khí (ml)				OMD (%)	ME (MJ)
	24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h		
Keo dậu	28,2	34,1	37,3	39,5	60,9	9,2
Lá sắn	26,4	32,3	34,1	34,0	57,5	8,2
Chè đại	18,1	26,2	28,9	30,9	53,4	6,8
Lá chè	16,2	22,4	24,2	25,2	43,1	6,1
Keo tai tượng	8,7	14,9	16,4	17,3	39,3	5,7
Keo lá trà	7,9	13,8	14,6	15,6	37,6	5,4

Số liệu ở bảng 3.2 cho thấy về tốc độ sinh khí *in vitro* gas production, tất cả các mẫu ủ có tốc độ sinh khí nhanh nhất trong giai đoạn đầu trong quá trình 96 giờ ủ. Tại cùng một thời điểm trong quá trình ủ thì lượng khí sinh ra từ mẫu khác nhau là không giống nhau trong đó mẫu keo dậu là cao nhất và thấp nhất ở mẫu keo lá trà.

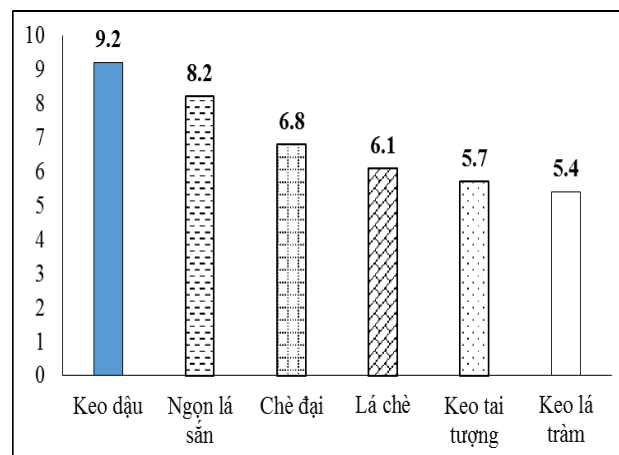


Hình 3.1. Tốc độ sinh khí qua các thời điểm lên men *in vitro* gasproduction của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin

Về các giá trị năng lượng trao đổi (ME) và tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (OMD), kết quả xử lý cho thấy lá keo dậu có giá trị ME (9,2MJ/kg vật chất khô) và OMD (60,9%) cao nhất trong khi đó các giá trị ME và OMD của keo lá trà (5,4MJ/kg vật chất khô và 37,6%) và keo tai tượng (5,7MJ/kg vật chất khô và 39,3%) là rất thấp trong điều kiện *in vitro* (hình 3.2 và 3.3).



Hình 3.2. Tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (OMD) của một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin (%)



Hình 3.3. Giá trị năng lượng (ME) một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin (MJ)

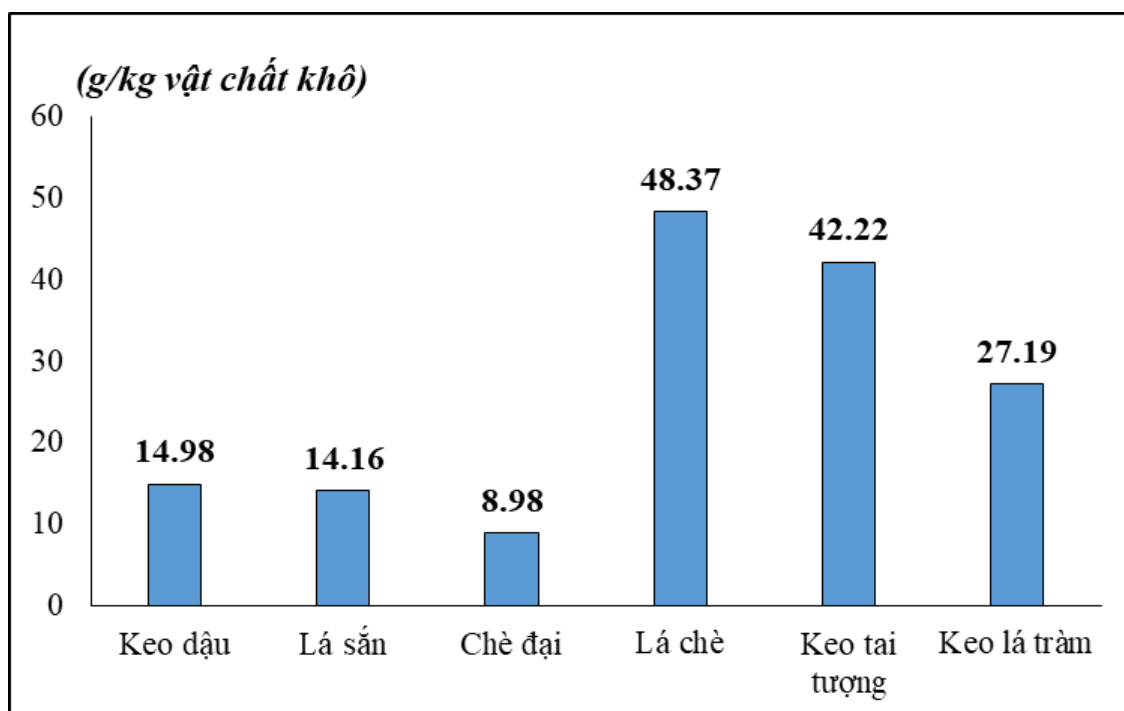
Bảng 3.3. Hàm lượng tanin và nồng độ mêtan sản sinh sau 96^h ủ một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin trong điều kiện *in vitro*

	VCK (%)	Tanin (g/kgVCK)	CH ₄ tại 96 ^h	
			%	ml
Keo dậu	22,65	14,98	23,0	9,1
Lá sắn	18,41	14,16	23,3	7,9
Chè đại	12,73	8,98	25,7	8,0
Lá chè	30,15	48,37	20,6	5,2
Keo tai tượng	35,76	42,22	23,0	4,0
Keo lá trà	32,52	27,19	22,9	3,6

Ghi chú: VCK: vật chất khô

Kết quả ở bảng 3.3 và minh họa qua Hình 3.4 cho thấy: Hàm lượng

tanin trong 6 loại lá cây ở đây dao động từ: 8,98g đến 48,37g/kg vật chất khô tương đương với 0,88 đến 4,84% theo vật chất khô. Hàm lượng tanin trong lá chè, keo tai tượng và keo lá tràm ở đây là khá cao (2,72 đến 4,84%) nếu so với hàm lượng này ở lá sắn, lá chè đại và keo dậu (0,88 đến 1,5%) và có thể sẽ ảnh hưởng nhiều đến tiêu hóa và lên men của khẩu phần khi bổ sung chúng và có thể tỷ lệ giảm metan cũng sẽ cao.

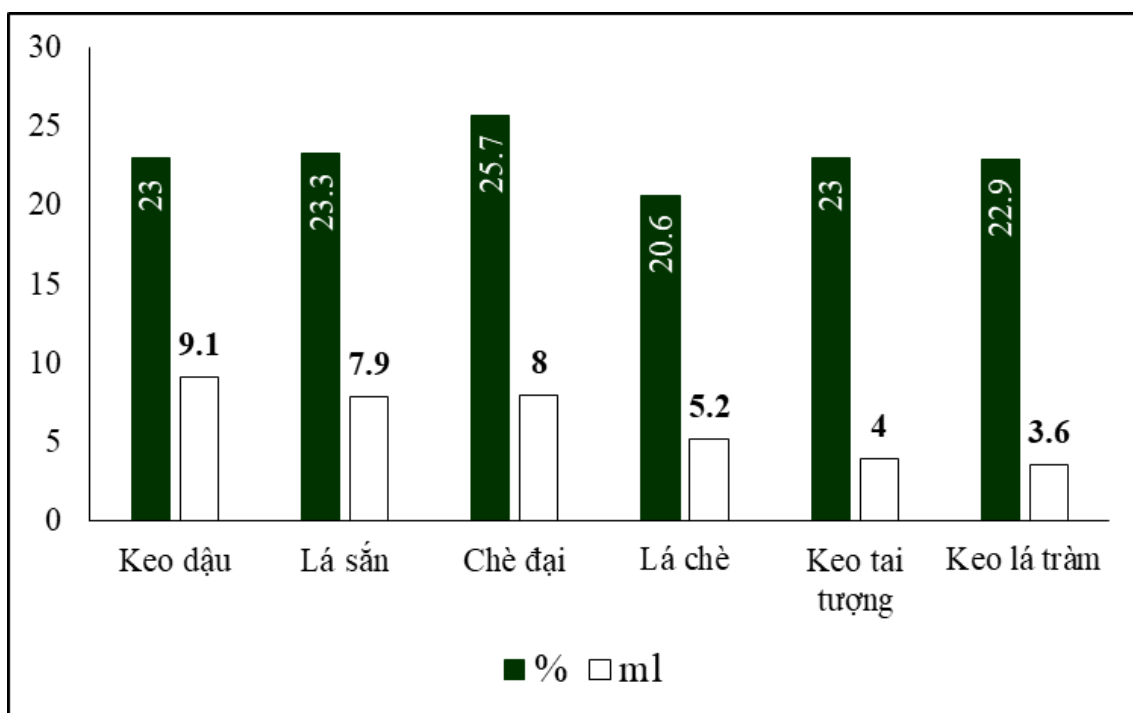


Hình 3.4. Hàm lượng tanin của các lá cây nghiên cứu

Theo Terrill và cs. (1989) thì mức thu nhận thức ăn của cừu sẽ không bị ảnh hưởng khi hàm lượng tanin chứa trong cây thức ăn thấp (3,1% - 8,7%), lượng thức ăn thu nhận của cừu chỉ bị ảnh hưởng khi trong khẩu phần ăn có hàm lượng tanin chứa trong cây thức ăn cao (18,1% VCK). Nghiên cứu của Aganga và cs. (1998) cho thấy lá các loại cây *Acacia* có hàm lượng tanin: 0,5-11,2% trong khi đó theo Jayanegara và cs. (2011) thì lá các loại cây *Acacia* có hàm lượng tanin tổng số: 10,5-23,6 %. Abdulrazak và cs. (2000) báo cáo về hàm lượng tổng tanin trong lá các loại cây *Acacia* tại Nigeria có mức dao động 5,1 đến 5,6%. Njiadda và Nasiru (2010) cho biết lá *Acacia tortilis* có

hàm lượng tanin tổng số là 0,32%.

Nồng độ khí mêtan sau 96 giờ sau ủ thấp nhất trong mẫu khí sản sinh ra trong quá trình ủ lá chè (20,6%) và cao nhất ở chè đại (25,7%). Tuy nhiên, do tổng lượng khí sản sinh ra trong mỗi loại thức ăn rất khác nhau nên lượng khí mêtan thải ra cũng không giống nhau nhiều nhất ở mẫu ủ keo đậu (9,1ml) và ít nhất ở mẫu ủ keo lá trà (3,6ml) (Hình 3.5)



Hình 3.5. Nồng độ mêtan sản sinh sau 96h ủ một số ngọn lá cây thức ăn chứa tanin trong điều kiện *in vitro*

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN VÀ MỨC BỔ SUNG MỘT SỐ LOẠI NGỌN LÁ CÂY THỨC ĂN CHỨA TANIN VÀO CHẤT NỀN ĐẾN TỐC ĐỘ VÀ ĐẶC ĐIỂM SINH KHÍ *IN VITRO*, LƯỢNG MÊTAN SẢN SINH, TỶ LỆ TIÊU HÓA *IN VITRO*, GIÁ TRỊ NĂNG LƯỢNG ME VÀ LƯỢNG AXIT BÉO MẠCH NGẮN

3.2.1. Thành phần hóa học của các khẩu phần thí nghiệm

Kết quả phân tích thành phần hóa học của khẩu phần thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Thành phần hóa học của các khẩu phần thí nghiệm (%VCK)

Nguồn tanin	Khẩu phần	VCK (%)	Protein thô	Lipit	Xơ thô	NDF	ADF	KTS	Tanin g/kgVCK
			% VCK						
	ĐC	25,21	12,91	2,03	22,54	42,70	26,36	10,22	0,13
Keo dậu (KD)	KD1	25,21	14,23	2,06	22,27	42,00	26,36	10,10	0,97
	KD2	24,80	15,35	2,03	21,90	41,75	25,80	9,90	2,11
	KD3	24,60	16,57	2,13	21,70	40,67	26,17	9,94	3,03
	KD4	24,17	17,99	2,16	21,53	40,00	25,16	9,59	4,12
	KD5	24,55	19,00	2,00	21,04	39,54	24,82	9,44	4,96
	KD6	24,30	19,23	2,23	20,91	38,65	24,57	9,37	6,01
Lá sắn (LS)	LS1	24,70	13,35	2,10	22,20	42,08	26,14	10,16	0,93
	LS2	24,20	14,78	2,28	21,87	41,47	25,80	10,22	2,21
	LS3	23,76	15,70	2,40	21,74	40,80	25,63	9,68	3,12
	LS4	23,28	16,62	2,32	21,21	40,12	25,56	10,00	4,10
	LS5	22,32	17,30	2,65	20,88	38,60	25,10	9,90	5,00
	LS6	22,12	18,30	2,80	20,48	39,00	24,87	9,80	6,07
Chè đại (CĐ)	CĐ1	23,82	13,06	1,96	21,60	42,80	26,25	9,87	1,05
	CĐ2	22,43	13,19	1,90	20,36	40,90	26,60	10,00	2,09
	CĐ3	21,40	13,38	1,94	19,81	40,02	26,05	9,50	3,10
	CĐ4	20,00	13,50	1,78	19,19	39,26	25,96	8,40	3,97
	CĐ5	18,60	13,70	1,47	17,99	38,20	25,81	9,45	5,10
	CĐ6	16,87	13,90	1,60	17,21	37,42	25,71	9,40	6,02
Lá chè (LC)	LC1	25,19	13,16	2,03	22,22	42,53	26,27	9,18	1,01
	LC 2	25,47	13,16	2,14	22,30	42,38	26,14	10,03	2,09
	LC 3	25,51	13,30	2,05	22,29	42,71	26,04	9,90	3,00
	LC 4	25,68	13,40	2,09	22,10	42,05	25,78	9,84	4,13
	LC 5	25,72	13,14	2,07	22,08	41,89	25,80	9,75	5,02
	LC 6	25,48	13,67	2,00	21,99	41,92	25,81	9,35	6,06
Keo tai tượng (KTT)	KTT1	25,40	12,90	2,05	22,58	42,71	26,46	10,03	1,13
	KTT2	25,70	13,00	2,01	22,55	42,70	26,50	9,48	2,03
	KTT3	26,00	13,23	1,99	22,66	43,17	26,49	9,87	3,09
	KTT4	26,20	13,10	2,11	22,70	42,70	26,78	9,75	4,12
	KTT5	26,72	13,19	2,18	22,24	42,38	27,15	9,73	5,31
	KTT6	26,37	13,20	2,15	22,78	43,11	26,96	9,44	6,12

Nguồn tanin	Khẩu phần	VCK (%)	Protein thô	Lipit	Xơ thô	NDF	ADF	KTS	Tanin g/kgVCK
			% VCK						
Keo lá trà (KLT)	KLT1	25,50	13,02	2,04	22,89	43,07	26,45	10,01	1,05
	KLT2	25,27	13,10	2,12	23,11	44,44	27,20	9,78	2,13
	KLT3	26,00	13,46	2,06	23,59	43,81	27,81	9,74	2,96
	KLT4	26,23	13,38	2,00	23,75	44,35	28,04	9,87	4,13
	KLT5	26,50	13,50	2,08	24,30	44,55	28,46	9,43	5,10
	KLT6	27,00	13,27	2,19	24,37	45,43	29,00	9,56	6,07
Tanin tinh khiết (TN)	TN 1	25,18	12,89	2,02	22,51	42,60	26,33	10,21	1,03
	TN 2	25,12	13,11	2,02	22,59	42,12	26,30	10,10	2,12
	TN 3	25,12	12,80	2,08	22,46	42,53	26,46	9,80	3,04
	TN 4	26,00	13,05	2,02	22,48	42,26	26,24	9,74	4,10
	TN 5	25,06	12,60	2,11	22,41	42,75	26,24	10,16	5,04
	TN 6	25,14	12,89	2,01	22,38	42,40	26,18	9,85	6,14

Số liệu bảng 3.4 cho thấy, so với khẩu phần đối chứng, khi bổ sung các loại lá ngọn lá cây keo dậu, lá sắn, hàm lượng protein thô của khẩu thí nghiệm tăng lên, trừ trường hợp bổ sung ngọn lá chè đại, lá chè, lá keo lá trà và lá keo tai tượng hàm lượng protein không tăng nhiều mặc dù các loại lá trên đều có protein cao nhưng tỷ lệ bổ sung không nhiều. Việc bổ sung tanin tinh khiết, protein thô không tăng.

Ở khẩu phần thí nghiệm với keo dậu, hàm lượng protein thô tăng từ 14,23 đến 19,23% còn ở khẩu phần thí nghiệm có lá sắn, hàm lượng protein thô tăng từ 13,35 đến 18,30% trong khi đó với lá chè, hàm lượng protein thô tăng từ 13,16 đến 13,67% còn khẩu phần thí nghiệm có lá keo tai tượng và lá keo lá trà thì hàm lượng protein thô tăng tương ứng từ 12,90 đến 13,19% và từ 13,02 đến 13,27%

Khi bổ sung lá ngọn lá cây keo dậu, lá sắn, chè đại, lá chè, lá keo tai tượng, lá keo lá trà và tanin tinh khiết, hàm lượng tanin của khẩu phần thí nghiệm tăng lên đáng kể. Ở khẩu phần lá, ngọn keo dậu hàm lượng tanin tăng

từ 0,97 đến 6,01 g tanin/kgVCK. Tương tự như vậy, ở các khẩu phần thí nghiệm bổ sung lá sắn, chè đại, lá chè, lá keo tai tượng, lá keo lá tràm và tanin tinh khiết, hàm lượng tanin đã tăng tương ứng từ: 0,93 đến 6,07; 1,05 đến 6,02; 1,01 đến 6,06; 1,13 đến 6,12; 1,05 đến 6,07 và 1,03 đến 6,14 g tanin/kgVCK.

So với khẩu phần đối chứng hàm lượng lipit, xơ thô, NDF, ADF, khoáng tổng số (Ash) của các khẩu phần thí nghiệm thay đổi không đáng kể. Ở cả 7 loại khẩu phần thí nghiệm, hàm lượng tanin cao nhất đạt đến trên 6,14 g tanin/kgVCK, còn hàm lượng protein thô cao nhất đạt được ở các khẩu phần này là khoảng 18-19%.

3.2.2. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến lượng khí tích lũy của các khẩu phần thí nghiệm (ml)

Lượng khí sinh ra trong điều kiện *in vitro* của các khẩu phần thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Lượng khí tích lũy của các khẩu phần thí nghiệm (ml)

Nguồn tanin	Khẩu phần	Thời gian ủ mẫu							
		3h	6h	9h	12h	24h	48h	72h	96h
	ĐC	3,2^{cde}	6,8^c	10,7^d	14,5^c	26,3^{de}	35,3^{cde}	38,4^{cde}	40,4^{cd}
Keo dậu (KD)	KD1	3,0 ^{cde}	6,3 ^{cd}	9,8 ^e	14,1 ^c	24,2 ^{efg}	34,3 ^{de}	34,7 ^{gh}	34,9 ^{ghi}
	KD2	3,0 ^{cde}	6,4 ^{cd}	10,3 ^{de}	14,1 ^c	24,4 ^{ef}	33,0 ^{ef}	34,9 ^{fgh}	35,2 ^{fgh}
	KD3	3,4 ^{bc}	6,7 ^c	10,5 ^{de}	14,7 ^c	26,9 ^{cd}	36,9 ^{abc}	37,4 ^{cdef}	38,1 ^{de}
	KD4	3,9 ^b	6,8 ^c	10,7 ^d	14,9 ^c	28,0 ^{bcd}	36,1 ^{bcd}	39,6 ^{abc}	40,1 ^{cd}
	KD5	4,8 ^a	7,6 ^b	11,5 ^c	15,7 ^{bc}	29,4 ^{ab}	38,0 ^{ab}	41,0 ^a	41,5 ^{bc}
	KD6	2,4 ^{fgh}	5,1 ^f	9,7 ^e	13,9 ^c	24,0 ^{fgh}	33,3 ^{ef}	34,6 ^{gh}	35,2 ^{fgh}
Lá sắn (LS)	LS1	2,8 ^{cdef}	10,0 ^a	14,9 ^{ab}	17,8 ^{ba}	27,8 ^{bcd}	35,0 ^{cde}	35,6 ^{fgh}	38,5 ^{de}
	LS2	3,1 ^{cde}	10,0 ^a	15,0 ^{ab}	18,0 ^a	27,9 ^{bcd}	35,0 ^{cde}	36,6 ^{efgh}	39,3 ^{cde}
	LS3	3,1 ^{cde}	10,2 ^a	15,0 ^{ab}	18,1 ^a	28,8 ^{abc}	36,5 ^{abcd}	39,4 ^{abcd}	42,8 ^{ab}
	LS4	3,4 ^{bcd}	10,3 ^a	15,5 ^{ab}	18,9 ^a	30,3 ^a	38,5 ^a	40,8 ^{ab}	43,7 ^{ab}
	LS5	3,8 ^b	10,3 ^a	15,6 ^a	18,9 ^a	30,4 ^a	38,5 ^a	41,4 ^a	44,0 ^a
	LS6	2,7 ^{ef}	9,7 ^a	14,7 ^b	17,8 ^{ba}	27,1 ^{cd}	33,5 ^{ef}	35,3 ^{fgh}	38,1 ^{de}
Chè đại (CĐ)	CĐ1	1,9 ^{hi}	3,6 ^g	6,4 ^{hi}	6,8 ^f	17,0 ^k	25,3 ^j	27,9 ^k	27,9 ^{kl}
	CĐ2	2,6 ^{efg}	4,7 ^f	7,1 ^{gh}	7,0 ^g	19,2 ^j	27,9 ⁱ	30,3 ^j	30,7 ^j
	CĐ3	2,8 ^{ef}	4,8 ^f	7,2 ^g	8,2 ^{gf}	20,1 ^{ij}	28,0 ⁱ	31,0 ^j	31,3 ^j

Nguồn tanin	Khẩu phần	Thời gian ủ mẫu							
		3h	6h	9h	12h	24h	48h	72h	96h
	CĐ4	2,8 ^{def}	5,1 ^{ef}	8,5 ^f	10,5 ^{egf}	21,9 ^{ghi}	28,6 ^{hi}	32,1 ^{ij}	32,8 ^{ij}
	CĐ5	3,8 ^b	5,8 ^{de}	8,9 ^f	10,7 ^{ed}	22,9 ^{fng}	33,4 ^{ef}	35,0 ^{fgh}	35,3 ^{fgh}
	CĐ6	1,1 ^j	3,5 ^g	5,4 ^{jk}	8,2 ^{gf}	16,4 ^k	24,0 ^j	26,3 ^k	26,3 ^l
Lá chè (LC)	LC1	3,1 ^{bac}	6,3 ^{ebdacf}	10,2 ^{bac}	13,5 ^{bac}	23,7 ^{gh}	31,4 ^{ed}	35,7 ^{bdac}	38,0 ^{ef}
	LC2	2,8 ^{ba}	5,8 ^{bdac}	9,8 ^{ba}	12,3 ^a	22,1 ^{ebdgcf}	29,3 ^{bdac}	32,3 ^{dc}	35,7 ^{ebdac}
	LC3	2,5 ^{ba}	5,1 ^{bac}	9,3 ^{ba}	11,5 ^a	20,5 ^{ebdacf}	27,3 ^{bac}	31,8 ^{bac}	34,0 ^{bdac}
	LC4	2,3 ^a	4,9 ^{ba}	8,5 ^{ba}	11,1 ^a	20,0 ^{ebdac}	26,5 ^{bac}	30,3 ^{ba}	32,0 ^{bac}
	LC5	2,0 ^a	4,5 ^a	8,0 ^a	10,7 ^a	19,97 ^{ba}	26,3 ^a	29,5 ^a	31,0 ^{ba}
	LC6	1,8 ^{bac}	3,7 ^{ebdac}	6,7 ^{bac}	9,5 ^{bac}	19,4 ^{ghf}	25,5 ^{edc}	27,3 ^{bdac}	29,0 ^{ebdcf}
Keo tai tượng (KTT)	KTT1	3,5 ^{ebdac}	7,4 ^{ebdacf}	12,0 ^{bac}	16,3 ^a	28,1 ^a	35,8 ^{bac}	37,3 ^{bac}	37,8 ^{bdac}
	KTT2	3,5 ^{ebdac}	7,0 ^{ebdacf}	11,5 ^{bac}	15,6 ^a	26,7 ^{bac}	33,6 ^{ebdac}	35,2 ^{bac}	36,3 ^{ebdac}
	KTT3	3,2 ^{ebdacf}	7,0 ^{ebdacf}	11,3 ^{bdac}	15,5 ^a	25,5 ^{bdac}	32,2 ^{ebdac}	34,6 ^{bac}	35,9 ^{ebdac}
	KTT4	3,0 ^{ebdcf}	6,7 ^{ebdagcf}	11,0 ^{ebdac}	14,8 ^{bac}	25,2 ^{ebdac}	31,6 ^{ebdac}	34,4 ^{bac}	35,6 ^{ebdac}
	KTT5	2,8 ^{ebdacf}	6,5 ^{ebdgcf}	10,3 ^{edfc}	13,6 ^{bdac}	24,0 ^{ebdacf}	31,2 ^{ebdac}	32,4 ^{bdc}	33,0 ^{edf}
	KTT6	2,5 ^{edcf}	6,4 ^{edgf}	9,7 ^{edfc}	13,5 ^{bdac}	23,1 ^{ebdacf}	29,7 ^{edfc}	31,4 ^{dc}	32,6 ^{edf}
Keo lá trà (KLT)	KLT1	4,0 ^{bdac}	7,4 ^{ebdacf}	11,5 ^{bac}	15,1 ^{ba}	24,9 ^{ebdac}	34,7 ^{bdac}	36,9 ^{bac}	38,4 ^{bdac}
	KLT2	3,8 ^{ebdac}	7,1 ^{ebdacf}	11,4 ^{bac}	15,0 ^{ba}	24,3 ^{ebdacf}	33,4 ^{ebdac}	36,1 ^{bac}	38,1 ^{bdac}
	KLT3	3,8 ^{ebdac}	6,9 ^{ebdacf}	10,6 ^{ebdcf}	14,2 ^{bac}	23,8 ^{ebdacf}	32,7 ^{ebdac}	35,5 ^{bac}	36,9 ^{ebdac}
	KLT4	3,7 ^{ebdac}	6,5 ^{edgcf}	9,8 ^{edfc}	11,5 ^{fdec}	20,8 ^{edgf}	29,9 ^{edfc}	32,6 ^{bdc}	34,5 ^{ebdcf}
	KLT5	3,6 ^{ebdac}	6,2 ^{ehgf}	9,7 ^{edfc}	11,4 ^{fdec}	20,3 ^{egf}	29,2 ^{edf}	31,2 ^{dc}	33,3 ^{edfc}
	KLT6	3,5 ^{ebdac}	5,8 ^{hgf}	9,0 ^{egdf}	11,2 ^{fdec}	19,6 ^{gf}	28,5 ^{ef}	30,7 ^{dc}	31,5 ^{ef}
Tanin tinh khiết	TN1	1,6 ⁱ	2,7 ^h	4,6 ^l	9,7 ^{edf}	20,4 ^{ij}	30,4 ^{gh}	33,9 ^{hi}	34,7 ^{hi}
	TN2	1,8 ^{hi}	3,1 ^{gh}	5,9 ^{ij}	10,1 ^{edf}	21,8 ^{hi}	31,2 ^{fg}	34,1 ^{hi}	35,1 ^{gh}
	TN3	2,1 ^{ghi}	3,5 ^g	6,1 ^{ij}	10,5 ^{edf}	22,2 ^{fghi}	31,5 ^{fg}	34,6 ^{gh}	35,4 ^{fgh}
	TN4	2,1 ^{ghi}	4,4 ^f	7,6 ^g	11,6 ^d	23,0 ^{fng}	33,2 ^{ef}	36,5 ^{efgh}	37,1 ^{efg}
	TN5	2,3 ^{fgh}	4,8 ^f	7,8 ^g	11,8 ^d	23,9 ^{fng}	33,4 ^{ef}	36,8 ^{efg}	37,5
	TN6	1,8 ^{hi}	3,2 ^{gh}	4,9 ^{kl}	8,3 ^{egf}	17,0 ^k	24,7 ^j	27,5 ^k	28,6 ^k

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Kết quả cho thấy: Lượng khí sinh ra tăng mạnh tại thời điểm từ 3h – 12h và tăng rất mạnh từ 12h - 48h, sau đó từ 48- 96h lượng khí sinh ra giảm dần. Kết quả sinh khí này phản ánh một qui luật chung là quá trình lên men *in vitro* diễn ra theo ba giai đoạn: giai đoạn đầu tiên khí được tạo thành do lên men phân hoà tan; ở giai đoạn hai khí được sinh ra do lên men phần không hoà tan và ở giai đoạn ba khí được sinh ra do phân huỷ quần thể vi sinh vật trong môi trường thí nghiệm (Cone và cs., 1996; Cone và cs., 1998). Nếu biểu

diễn lượng khí sinh ra bằng đồ thị chúng ta sẽ thấy rõ các giai đoạn này.

Do các khẩu phần thí nghiệm khác nhau về thành phần hóa học (chủ yếu là hàm lượng protein) và lượng tanin bổ sung và loại lá bổ sung nên khí tích lũy ở các thời điểm khác nhau là khác nhau ở các khẩu phần.

Khuynh hướng chung là hàm lượng tanin tăng từ 1 đến 6 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì lượng khí sinh ra ở các thời điểm và khí tích lũy lúc 96 giờ giảm dần so với lượng khí sinh ra ở khẩu phần đối chứng (lượng khí biến động nhưng không có qui luật), mặc dù có sự sai khác về lượng khí sinh ra tại cùng thời điểm giữa các khẩu phần ở cùng mức tanin ($P < 0,05$). Tuy nhiên khi hàm lượng tanin tăng đến 6 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì lượng khí sinh ra ở các thời điểm và khí tích lũy lúc 96 giờ bị ảnh hưởng nhiều và giảm mạnh so với lượng khí sinh ra ở khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có tanin thấp hơn ($P < 0,05$). Ví dụ tốc độ giảm rất khác nhau khi khẩu phần có tanin từ các nguồn khác nhau: lá chè, lá keo tai tượng, lá keo lá tràm hay tanin tinh khiết ($P < 0,05$). Giảm tổng lượng khí tích lũy lúc 96 h mạnh nhất ở khẩu phần có tanin tinh khiết, sau đó đến lá chè, lá keo tai tượng và cuối cùng là lá keo lá tràm.

Nguyên nhân dẫn đến các sai khác về lượng khí sinh tại cùng thời điểm giữa các khẩu phần ở cùng mức tanin từ 1 đến 6g/kg VCK của khẩu phần khá phức tạp và không thể chỉ do một nguyên nhân gây ra. Theo Pellikaan và cs. (2011), lượng khí sinh ra trong điều kiện *in vitro* và lượng CH_4 tạo ra phụ thuộc vào đặc tính của tanin như loại tanin (condensed hay ellagitannins hay gallotannins), độ hòa tan của tanin. Ảnh hưởng của tanin là có điều kiện và phụ thuộc vào thành phần của chúng (Waghorn, 2008; Goel và Makkar, 2012). Ngoài ra có rất nhiều yếu tố có thể đã qui định lượng khí đã sản sinh ra trong suốt quá trình lên men, như loại và mức xơ, sự có mặt của các chất trao đổi thứ

cấp như saponin (Babayemi và cs., 2009), hàm lượng protein thô của khẩu phần, các thành phần kháng dinh dưỡng khác (Njiadda và Nasiru, 2010). Bản chất của carbohydrate cũng có những ảnh hưởng đến lượng khí sinh ra (Sallam và cs., 2007; Blummel và cs., 1997; Menke và Steingass, 1988) và Chenost và cs., 1997).

Sự khác biệt về khí tích lũy lúc 96 giờ và sự giảm khí tích lũy lúc 96 giờ ở cùng một mức tanin: 6 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm so với khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có mức tanin thấp hơn có thể do nhiều nguyên nhân gây nên. Sự thay đổi tỷ lệ tanin đã ảnh hưởng đến hoạt động của các emzym vi sinh vật trong dịch dạ cỏ, đặc biệt là các vi sinh vật phân giải xơ (McMahon và cs., 2000). Theo Horigome và cs. (1988) khi hàm lượng tanin trở nên quá cao trong khẩu phần thì hoạt động của enzyme vi sinh vật cho tiêu hóa xơ và protein có thể bị suy giảm. Mặt khác, tanin đã làm giảm số lượng vi khuẩn và protozoa trong dịch dạ cỏ bởi vì tanin có thể liên kết với protein trên bề mặt tế bào của các loài vi sinh vật này như là một độc tố làm chúng không thể thực hiện quá trình trao đổi chất cũng như phân chia tế bào (Makkar và cs., 1995).

Trong nghiên cứu này kết quả lượng khí sinh ra của tất cả các mẫu tại các thời điểm ử thấp hơn so với các nghiên cứu trước đây của Getachew và cs. (2002) và của Menke và cs. (1979). Sự sai khác này có thể do sự khác biệt trong thành phần hóa học và mức bổ sung của mẫu (Hamid và cs., 2007). Mặt khác, vùng khí hậu cũng ảnh hưởng đến sự biến động của lượng khí sinh ra trong điều kiện *in vitro*. Các nghiên cứu của các tác giả trên đều thực hiện trên các loại thức ăn ở vùng ôn đới, nơi có cường độ chiếu sáng không cao. Ngược lại, các mẫu thức ăn trong nghiên cứu này được thu thập tại vùng nhiệt đới vào mùa hè có cường độ chiếu sáng cao. Do đó, các mẫu này thường có hàm lượng các chất kháng dinh dưỡng như tanin, saponin cao hơn (Saffarsadeh và

cs., 2000).

3.2.3. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến động thái sinh khí *in vitro* của các khẩu phần thí nghiệm

Động thái sinh khí *in vitro* phản ánh tiềm năng phân giải của thức ăn trong môi trường dạ cỏ và được mô tả bằng các thông số a, b, ($|a| + b$), c và lag time. Động thái sinh khí của mẫu thức ăn trong điều kiện *in vitro* được trình bày trong bảng 3.6.

Bảng 3.6: Động thái sinh khí của các khẩu phần thí nghiệm

Nguồn tanin	Mẫu (n=3)	Các tham số ước tính				
		a	B	$ a + b$	c	L
	ĐC	-2,76^{cde}	43,6^{abc}	46,4^{abc}	0,043^{hfeg}	3,4^{de}
Keo đậu (KD)	KD1	-3,6 ^{kl}	39,8 ^{ef}	43,4 ^{efg}	0,050 ^{fdec}	3,6 ^{dc}
	KD2	-3,45 ^{ijk}	39,6 ^{ef}	43,0 ^{fgh}	0,051 ^{fdec}	3,6 ^{dc}
	KD3	-4,04 ^{mn}	43,2 ^{abc}	47,3 ^{ab}	0,050 ^{fdec}	3,8 ^{dc}
	KD4	-3,3 ^{ghij}	44,3 ^{ab}	47,6 ^{ab}	0,047 ^{hfdeg}	3,8 ^{dc}
	KD5	-2,95 ^{defg}	45,6 ^a	48,5 ^a	0,047 ^{fdeg}	4,1 ^{dc}
	KD6	-4,39 ^o	40,4 ^{de}	44,8 ^{cdef}	0,050 ^{fdec}	3,7 ^{dc}
Lá sắn (LS)	LS1	-3,33 ^{hij}	40,6 ^{de}	43,9 ^{def}	0,063 ^a	2,6 ^f
	LS2	-2,66 ^{bcd}	40,7 ^{de}	43,4 ^{efg}	0,059 ^{bac}	2,6 ^f
	LS3	-1,95 ^a	43,4 ^{abc}	45,4 ^{bcde}	0,051 ^{fdec}	2,4 ^f
	LS4	-2,87 ^{def}	45,5 ^a	48,4 ^a	0,055 ^{bdac}	2,7 ^{fe}
	LS5	-2,5 ^{bc}	45,3 ^a	47,5 ^{ab}	0,053 ^{bdec}	2,7 ^{fe}
	LS6	-3,02 ^{efgh}	39,6 ^{ef}	42,6 ^{fghi}	0,062 ^{ba}	2,5 ^f
Chè đại (CĐ)	CĐ1	-3,71 ^{klm}	33,6 ^h	37,3 ^j	0,037 ^{hg}	5,8 ^b
	CĐ2	-4,04 ^{mn}	36,7 ^g	40,7 ^{hi}	0,038 ^{hg}	6,1 ^{ba}
	CĐ3	-3,77 ^{klm}	36,8 ^g	40,5 ⁱ	0,039 ^{hg}	6,2 ^{ba}
	CĐ4	-3,73 ^{klm}	37,5 ^{fg}	41,3 ^{ghi}	0,044 ^{hfeg}	6,5 ^{ba}
	CĐ5	-4,26 ^{no}	41,4 ^{cde}	45,6 ^{bcde}	0,042 ^{hfg}	6,7 ^a
	CĐ6	-2,91 ^{def}	30,7 ⁱ	33,6 ^k	0,039 ^{hg}	5,8 ^b
Lá chè	LC1	-1,57 ^{bdac}	39,96 ^{ebdagcf}	41,52 ^{bdac}	0,040 ^{edf}	3,2 ^{bac}

Nguồn tanin	Mẫu (n=3)	Các tham số ước tính				
		a	B	a +b	c	L
(LC)	LC2	-1,47 ^{bdac}	37,02 ^{ebdagcf}	38,49 ^{bdac}	0,040 ^{edf}	3,2 ^{bc}
	LC3	-1,32 ^{bdac}	35,85 ^{ebdagcf}	37,17 ^{bdac}	0,037 ^f	3,0 ^c
	LC4	-1,84 ^{ebdac}	34,19 ^{edgf}	36,02 ^{dc}	0,040 ^{edf}	3,3 ^{bac}
	LC5	-2,59 ^{ebdac}	33,90 ^{egf}	36,49 ^{bdac}	0,042 ^{edfc}	3,4 ^{bac}
	LC6	-3,42 ^{ebdc}	32,61 ^g	36,03 ^{dc}	0,045 ^{ebdfc}	3,9 ^{bac}
Keo tai tượng (KTT)	KTT1	-4,53 ^e	42,77 ^{ba}	47,31 ^a	0,057 ^a	3,4 ^{bac}
	KTT2	-3,23 ^{ebdac}	36,77 ^{ebdagcf}	40,58 ^{bdac}	0,053 ^{bac}	3,6 ^{bac}
	KTT3	-4,19 ^{ed}	40,45 ^{ebdac}	44,64 ^{bac}	0,057 ^a	3,3 ^{bac}
	KTT4	-3,93 ^{edc}	39,16 ^{ebdagcf}	43,10 ^{bdac}	0,055 ^{ba}	3,2 ^{bac}
	KTT5	-2,53 ^{ebdac}	38,50 ^{ebdagcf}	41,02 ^{bdac}	0,050 ^{ebdac}	3,4 ^{bac}
	KTT6	-2,02 ^{ebdac}	34,73 ^{edgcf}	36,75 ^{bdac}	0,051 ^{bdac}	3,4 ^{bac}
Keo lá trà (KLT)	KLT1	-1,54 ^{bdac}	40,56 ^{ebdac}	42,10 ^{bdac}	0,038 ^f	3,3 ^{bac}
	KLT2	-1,32 ^{bdac}	39,74 ^{ebdagcf}	41,06 ^{bdac}	0,044 ^{edfc}	3,2 ^{bc}
	KLT3	-1,43 ^{bdac}	38,95 ^{ebdagcf}	40,38 ^{bdac}	0,043 ^{edfc}	3,4 ^{bac}
	KLT4	-0,47 ^a	37,05 ^{ebdagcf}	39,27 ^{bdac}	0,043 ^{edfc}	3,0 ^c
	KLT5	-0,76 ^{ba}	36,73 ^{ebdagcf}	38,55 ^{bdac}	0,038 ^f	3,3 ^{bac}
	KLT6	-1,11 ^{bac}	33,86 ^{egf}	35,01 ^d	0,040 ^{edf}	3,7 ^{bac}
Tanin tinh khiết (TN)	TN1	-3,85 ^{lm}	39,0 ^{efg}	42,8 ^{fghi}	0,037 ^h	4,2 ^c
	TN2	-3,34 ^{hij}	39,5 ^{ef}	42,9 ^{fghi}	0,038 ^{hg}	4,2 ^c
	TN3	-3,27 ^{ghij}	42,4 ^{bcd}	45,7 ^{bcde}	0,039 ^{hg}	4,2 ^{dc}
	TN4	-2,36 ^b	43,5 ^{abc}	45,9 ^{bcd}	0,039 ^{hg}	3,9 ^{dc}
	TN5	-3,17 ^{fghi}	43,7 ^{abc}	46,9 ^{abc}	0,039 ^{hg}	4,1 ^{dc}
	TN6	-3,22 ^{fghi}	33,0 ^h	36,2 ^j	0,038 ^{hg}	3,7 ^{dc}

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$); a = Sản lượng khí từ các chất dễ hòa tan (ml); b = Sản lượng khí từ các chất khó hòa tan (ml); |a| + b: Tiềm năng sinh khí (ml); c = Tốc độ sinh khí (%/h); L = Thời gian từ lúc ủ đến lúc bắt đầu sản sinh khí (ml)

Kết quả ở bảng cho thấy: Do các khẩu phần thí nghiệm khác nhau về thành phần hóa học (chủ yếu là hàm lượng protein) và lượng tanin bổ sung, loại lá bổ sung nên các thông số a, b, (|a|+b), c và L là khác nhau ở các khẩu phần.

Khuynh hướng chung là hàm lượng tanin tăng từ 1 đến 5 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì a, b, ($|a|+b$), c và L không bị ảnh hưởng nhiều so với các thông số này ở khẩu phần đối chứng (các thông số biến động nhưng không có qui luật), mặc dù có sự sai khác về giá trị a, b, ($|a|+b$), c và L giữa các khẩu phần ở cùng mức tanin ($P < 0,05$). Tuy nhiên, khi hàm lượng tanin tăng đến 6 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì các thông số a, b, ($|a|+b$), c và L bị ảnh hưởng nhiều và giảm mạnh so với các thông số này ở khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có tanin thấp hơn ($P < 0,05$).

Nguyên nhân dẫn đến các sai khác về các thông số a, b, ($|a|+b$), c và L giữa các khẩu phần ở cùng mức tanin từ 1 đến 5 g/kg VCK của khẩu phần là khá phức tạp và không thể chỉ do một nguyên nhân gây ra. Các nguyên nhân này cũng tương tự như với tổng lượng khí sinh ra tại các thời điểm khác nhau và có thể bao gồm: loại tanin, độ hòa tan của tanin (Pellikaan và cs., 2011; Waghorn, 2008; Goel và Makkar, 2012), loại và mức xơ, sự có mặt của các chất trao đổi thứ cấp (Babayemi và cs., 2009), hàm lượng protein thô của khẩu phần, các thành phần kháng dinh dưỡng khác (Njiadda và Nasiru, 2010), bản chất của carbohydrate (Sallam và cs., 2007; Blummel và cs., 1997; Menke và Steingass, 1988 và Chenost và cs., 1997). Động thái của sự sinh khí phụ thuộc vào tỷ lệ tương đối của phân tan và không tan trong thức ăn (Sallam và cs., 2007).

Nguyên nhân dẫn đến các sai khác và giảm giá trị của các thông số a, b, ($|a|+b$), c và L ở cùng một mức tanin: 6 g/kg VCK của khẩu phần thí nghiệm so với khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có mức tanin thấp hơn cũng có thể do nhiều nguyên nhân gây nên. Sự thay đổi tỷ lệ tanin đã ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme vi sinh vật trong dịch dạ cỏ, đặc biệt là các vi sinh vật phân giải xơ (McMahon và cs., 2000). Theo Horigome và cs. (1988) khi hàm lượng tanin trở nên quá cao trong khẩu phần thì hoạt động của enzyme vi

sinh vật cho tiêu hóa xơ và protein có thể bị suy giảm. Mặt khác, tanin đã làm giảm số lượng vi khuẩn và protozoa trong dịch dạ cỏ bởi vì tanin có thể liên kết với protein trên bề mặt tế bào của các loài vi sinh vật này như là một loại độc tố làm chúng không thể thực hiện quá trình trao đổi chất cũng như phân chia tế bào (Makkar và cs., 1995).

Giá trị (a) âm ở tất cả các khẩu phần đây là điểm chặn của trục tung và đây là thời kỳ mà mặc dù vi khuẩn vẫn hoạt động nhưng chưa sinh khí khi lên men mẫu thức ăn. Một số tác giả cũng công bố giá trị âm của (a) với các loại mẫu thức ăn khác nhau khi sử dụng mô hình toán học để đánh giá động lực sinh khí (Blummel và cs., 1997; Khazaal và cs., 1993).

3.2.4. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, ME và SCFA của các khẩu phần thí nghiệm

Các giá trị về tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, ME, SCFA được ước tính thông qua kỹ thuật sinh khí *in vitro* được trình bày trong bảng 3.7.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của loại lá và hàm lượng tanin tổng số đến tỷ lệ tiêu hóa *in vitro*, giá trị năng lượng trao đổi (ME) và số lượng các axit béo mạch ngắn (SCFA) của các khẩu phần thí nghiệm

Nguồn tanin	Mẫu n = 3	Tỷ lệ tiêu hóa chất khô (%)	Tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (%)	ME (MJ/kgDM)	SCFA (mlmol/200g DM)
	ĐC	45,7^{hi}	46,1^{ghi}	6,99^{gh}	0,57^{ed}
Keo dậu (KD)	KD1	43,8 ^{ij}	43,9 ^{kijl}	6,89 ^{ih}	0,52 ^{ef}
	KD2	45,3 ^{hi}	47,7 ^{efg}	7,08 ^{gh}	0,52 ^{ef}
	KD3	48,1 ^{efg}	50,4 ^{cd}	7,60 ^{ed}	0,58 ^{dc}
	KD4	50,2 ^{cde}	50,5 ^{cd}	7,98 ^{bc}	0,61 ^{bdc}
	KD5	54,6 ^b	55,9 ^a	8,33 ^a	0,64 ^{ba}
	KD6	44,2 ^{ij}	47,0 ^{fgh}	7,63 ^{ed}	0,51 ^{gf}
Lá sắn (LS)	LS1	46,7 ^{fgh}	48,4 ^{def}	7,26 ^{gf}	0,60 ^{bdc}
	LS2	48,7 ^{ef}	49,3 ^{cdef}	7,46 ^{ef}	0,61 ^{bdc}

Nguồn tanin	Mẫu n = 3	Tỷ lệ tiêu hóa chất khô (%)	Tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (%)	ME (MJ/kgDM)	SCFA (mlmol/200g DM)
	LS3	51,2 ^{cd}	52,7 ^b	7,72 ^{ecd}	0,63 ^{bac}
	LS4	53,9 ^b	55,3 ^a	8,07 ^{ba}	0,66 ^a
	LS5	58,0 ^a	56,1 ^a	8,19 ^{ba}	0,67 ^a
	LS6	49,4 ^{de}	50,5 ^{cd}	7,90 ^{bcd}	0,59 ^{dc}
Chè đại (CĐ)	CĐ1	40,2 ^l	41,7 ^{lm}	5,75 ^m	0,34 ^j
	CĐ2	41,3 ^{kl}	42,3 ^{klm}	6,07 ^{ml}	0,40 ⁱ
	CĐ3	42,4 ^{jk}	43,2 ^{jkl}	6,22 ^{kl}	0,42 ^{ih}
	CĐ4	45,1 ^{hi}	45,1 ^{hij}	6,48 ^{kj}	0,46 ^{gh}
	CĐ5	45,2 ^{hi}	47,0 ^{fgh}	6,65 ^{ij}	0,49 ^{gf}
	CĐ6	43,8 ^{ij}	44,5 ^{kij}	5,78 ^m	0,33 ^j
Lá chè (LC)	LC1	39,0 ^{thg}	40,2 ^{gthe}	6,70 ^{ebdacf}	0,51 ^{ebdagcf}
	LC2	37,6 ^k	38,1 ^k	6,43 ^{ebdcf}	0,47 ^{edgcf}
	LC3	32,5 ^{ji}	34,1 ^{ij}	6,27 ^{edgcf}	0,43 ^{ehgf}
	LC4	24,7 ^l	24,3 ^l	6,20 ^{edgcf}	0,42 ^{hgf}
	LC5	22,7 ^l	23,8 ^l	6,17 ^{gf}	0,42 ^{hgf}
	LC6	21,4 ^l	23,3 ^l	6,13 ^{gf}	0,40 ^{hg}
Keo tai tượng (KTT)	KTT1	47,5 ^{fcebd}	49,8 ^{dfce}	7,27 ^a	0,61 ^a
	KTT2	47,4 ^{fcde}	49,7 ^{dc}	6,70 ^{ebdacf}	0,58 ^{ba}
	KTT3	46,2 ^{fg}	45,4 ^{gdfhge}	7,10 ^{ba}	0,55 ^{bac}
	KTT4	41,4 ^{jk}	42,8 ^{kj}	6,93 ^{bdac}	0,54 ^{bdac}
	KTT5	40,7 ^{hgi}	41,1 ^{gfh}	6,90 ^{ebdac}	0,51 ^{ebdagcf}
	KTT6	36,7 ^{fe}	37,9 ^{gdfhe}	6,60 ^{ebdacf}	0,49 ^{ebdgcf}
Keo lá trà (KLT)	KLT1	48,2 ^{cebd}	49,4 ^c	6,82 ^{ebdacf}	0,54 ^{ebdac}
	KLT2	47,0 ^{cebd}	48,4 ^{dfce}	6,75 ^{ebdacf}	0,52 ^{ebdacf}
	KLT3	46,6 ^{fcde}	46,2 ^{gdfhe}	6,73 ^{ebdacf}	0,51 ^{ebdagcf}
	KLT4	46,8 ^{fed}	45,5 ^{gdfce}	6,31 ^{edgcf}	0,44 ^{edhgf}
	KLT5	45,9 ^{cebd}	44,1 ^{dce}	6,26 ^{edgcf}	0,43 ^{ehgf}
	KLT6	39,2 ^{fed}	38,2 ^{gdfce}	6,13 ^{gf}	0,41 ^{hg}
Tanin tinh khiết (TN)	TN1	46,0 ^{ghi}	47,9 ^{efg}	6,20 ^{kl}	0,43 ^{ih}
	TN2	48,3 ^{ef}	49,2 ^{cdef}	6,41 ^{kj}	0,46 ^{gh}
	TN3	51,4 ^{cd}	49,6 ^{cde}	6,42 ^{kj}	0,47 ^{gfh}
	TN4	52,5 ^{bc}	50,6 ^{bcd}	6,57 ^{ij}	0,49 ^{gf}
	TN5	52,5 ^{bc}	50,8 ^{bc}	6,62 ^{ij}	0,51 ^{gf}
	TN6	39,2 ^l	40,2 ^m	5,73 ^m	0,34 ^j

Các giá trị trung bình trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$).

Kết quả bảng 3.7 cho thấy: Do các khẩu phần thí nghiệm khác nhau về thành phần hóa học (chủ yếu là hàm lượng protein), lượng tanin bổ sung và loại lá bổ sung nên tỷ lệ tiêu hóa chất khô và chất hữu cơ *in vitro*, ME, SCFA là khác nhau ở các khẩu phần.

Khuynh hướng chung là hàm lượng tanin tăng từ 1 đến 5 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì tỷ lệ tiêu hóa chất khô và chất hữu cơ *in vitro*, ME, SCFA tăng không nhiều so với tỷ lệ tiêu hóa chất khô và chất hữu cơ *in vitro*, ME, SCFA ở khẩu phần đối chứng, mặc dù có sự sai khác giữa các khẩu phần ở cùng mức tanin ($P < 0,05$). Tuy nhiên, khi hàm lượng tanin tăng đến 6 g/kg vật chất khô của khẩu phần thí nghiệm thì tỷ lệ tiêu hóa chất khô và chất hữu cơ *in vitro*, ME, SCFA của khẩu phần thí nghiệm bị ảnh hưởng nhiều và giảm mạnh so với tỷ lệ tiêu hóa chất khô và chất hữu cơ *in vitro*, ME, SCFA ở khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có tanin thấp hơn ($P < 0,05$).

Ở cùng một mức tanin 6g/kg vật chất khô của khẩu phần thí nghiệm, tỷ lệ tiêu hóa chất khô cho KD6, LS6, CD6, LC6, KTT6, KLT6 và TN6 tương ứng là: 44,2; 49,4; 45,2; 21,2; 36,7; 39,2 và 39,2 %, thấp hơn tỷ lệ này ở khẩu phần đối chứng (45,7%) (trừ trường hợp LS6) và cũng thấp hơn ở các khẩu phần thí nghiệm khác có mức tanin từ 3 đến 5 g/kg vật chất khô của khẩu phần thí nghiệm. Ở cùng một mức tanin 6 g/kg vật chất khô của khẩu phần thí nghiệm, tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ, ME và SCFA cũng diễn biến theo một khuynh hướng tương tự.

Các nguyên nhân giải thích cho các khuynh hướng biến động của tỷ lệ tiêu hóa chất khô và chất hữu cơ *in vitro*, ME và SCFA là do ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung chính là các nguyên nhân gây biến

động về lượng khí *in vitro* sinh ra như đã thảo luận ở trên.

Lượng khí sinh ra có tương quan dương (+) với tỷ lệ tiêu hóa *in vitro* (Sallam và cs., 2007; Nitipot và Sommart, 2003; Al-Masri, 2003; Chenost và cs., 2001; Sommart và cs., 2000; Chenost và cs., 1997); Romney và cs., 1997; Datt và Singh, 1995; Steingass và Menke, 1986; Menke và Steingass, 1988), với SCFA (Getachew và cs., 2002; Sommart và cs., 2000; Blummel và Ørskov, 1993; Beuvink và Spoelstra, 1992; Blummel và cs., 1999; và với ME (Sallam và cs., 2007; Getachew và cs., 2002; Sommart và cs., 2000; Getachew và cs., 1998); Aiple và cs., 1996; Krishnamoorthy và cs., 1995); Menke và Steingass, 1988).

Theo Jayanegara và cs. (2011): Tổng tanin có tương quan âm (-) với tổng SCFA (-0,59) và có tương quan âm với tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (-0,53). Khi hàm lượng tanin tổng số tăng thường làm giảm SCFA vì tanin đã làm giảm tỷ lệ phân giải chất hữu cơ trong dạ cỏ, do tương tác với protein và xơ trong khẩu phần làm giảm chậm tiêu hóa (McSweeney và cs., 2001; Mueller-Harvey, 2006; Tiemann và cs., 2008).

3.2.5. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin bổ sung đến lượng mêtan sản sinh ra sau 96 giờ ủ của các khẩu phần thí nghiệm

Kết quả của nội dung nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.8; 3.9 và 3.10.

Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy: Do các khẩu phần thí nghiệm khác nhau về thành phần hóa học (chủ yếu là hàm lượng protein), lượng tanin bổ sung và loại lá bổ sung nên nồng độ và thể tích mêtan là khác nhau ở các khẩu phần.

Thể tích mêtan sinh ra ở các khẩu phần KD6, LS6, CD6, LC6, KTT6, KLC6 và TN6 (có cùng hàm lượng tanin 6 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm) sai khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) và lần lượt là 7,1; 7,8;

5,9; 5,5; 5,3; 6,5 và 5,4 ml/200mg chất khô của khẩu phần. So với khẩu phần đối chứng, các khẩu phần KD6, LS6, CĐ6, LC6, KTT6, KLC6 và TN6 đã làm giảm lượng mêtan sinh ra ở dạ cỏ tương ứng: 36,0; 29,7; 46,8; 50,45; 52,25; 41,4 và 51,4%.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của loại lá và hàm lượng tanin tổng số đến nồng độ và thể tích khí mêtan sản sinh ra sau 96 giờ ủ

Nguồn tanin	Khẩu phần	Nồng độ CH ₄ (%)	Thể tích CH ₄ (ml)	Giảm ml CH ₄ (%)
	ĐC	27,5^a	11,1^a	0
Keo dậu (KD)	KD1	27,8 ^a	9,7 ^{cb}	12,6
	KD2	26,8 ^{bac}	9,4 ^{cbd}	15,3
	KD3	26,2 ^{bedc}	10,0 ^b	9,9
	KD4	23,7 ^h	9,5 ^{cbd}	14,4
	KD5	22,4 ⁱ	9,3 ^{cbd}	16,2
	KD6	20,2 ^{kj}	7,1 ^k	36,0
Lá sắn (LS)	LS1	25,5 ^{fed}	9,8 ^b	11,7
	LS2	25,0 ^{fg}	9,8 ^b	11,7
	LS3	25,0 ^{feg}	10,7 ^a	3,6
	LS4	22,1 ⁱ	9,6 ^{cb}	13,5
	LS5	22,5 ⁱ	9,9 ^b	10,8
	LS6	20,6 ^j	7,8 ^{ihj}	29,7
Chè đại (CĐ)	CĐ1	26,9 ^{ba}	7,5 ^{lkj}	32,4
	CĐ2	26,2 ^{fbedc}	8,0 ^{ihg}	27,9
	CĐ3	25,6 ^{fedc}	8,0 ^{ihg}	27,9
	CĐ4	24,2 ^{hg}	7,9 ^{ihg}	28,8
	CĐ5	23,1 ^{hi}	8,1 ^{ihg}	27,0
	CĐ6	22,4 ⁱ	5,9 ^l	46,8
Lá chè (LC)	LC1	25,8 ^{bc}	9,8 ^{bc}	11,71
	LC2	24,1 ^{ef}	8,6 ^{ecd}	22,52
	LC3	23,8 ^{egf}	8,1 ^{ef}	27,03
	LC4	22,5 ^{ihgj}	7,2 ^{gf}	35,14
	LC5	21,0 ^{lk}	6,5 ^{ghi}	41,44
	LC6	19,2 ^{nm}	5,5 ^{hi}	50,45
Keo tai tượng	KTT1	27,0 ^{ba}	10,2 ^{ba}	8,11

Nguồn tanin	Khẩu phần	Nồng độ CH ₄ (%)	Thể tích CH ₄ (ml)	Giảm ml CH ₄ (%)
(KTT)	KTT2	26.1 ^{bc}	9,5 ^{bcd}	14,41
	KTT3	25.5 ^{dc}	9,2 ^{becd}	17,12
	KTT4	23.4 ^{ehgf}	8,3 ^{efd}	25,23
	KTT5	21.8 ^{ikj}	7,2 ^{gf}	35,14
	KTT6	20.1 ^{lm}	5,3 ⁱ	52,25
Keo lá trà (KLT)	KLT1	25.8 ^{bc}	10,2 ^{ba}	8,11
	KLT2	24.1 ^{ef}	9,8 ^{bc}	11,71
	KLT3	23.8 ^{egf}	9,0 ^{becd}	18,92
	KLT4	22.5 ^{ihgi}	7,9 ^{ef}	28,83
	KLT5	21.0 ^{lk}	7,1 ^{gf}	36,04
	KLT6	19.2 ^{nm}	6,5 ^{ghi}	41,44
Tanin tinh khiết (TN)	TN1	26,3 ^{bdc}	9,1 ^{ced}	18,0
	TN2	25,4 ^{fed}	8,9 ^{fed}	19,8
	TN3	24,2 ^{hg}	8,6 ^{feg}	22,5
	TN4	22,4 ⁱ	8,3 ^{fhg}	25,2
	TN5	19,3 ^{kl}	7,2 ^{kj}	35,1
	TN6	18,7 ^l	5,4 ^l	51,4

Các giá trị trung bình trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Sự khác biệt về nồng độ và thể tích mêtan ở các khẩu phần có nguồn tanin khác nhau và thậm chí có cùng nguồn tanin nhưng khác nhau về hàm lượng tanin do các nguyên nhân khác nhau tạo nên. Trước hết sự khác biệt về thể tích mêtan tạo ra của các khẩu phần có cùng hàm lượng tanin nhưng khác nhau về nguồn là do ảnh hưởng của loại tanin có trong khẩu phần. Theo Goel và Makkar (2012), ảnh hưởng giảm thiểu mêtan của tanin phụ thuộc vào loại tanin (cấu trúc hóa học) và có tương quan thuận với số lượng nhóm hydroxyl trong cấu trúc của nó. Về tổng thể hydrolyzable tanin (tanin thủy phân) có xu hướng tác động trực tiếp làm ức chế vi khuẩn sinh mêtan ở dạ cỏ (rumen methanogens) trong khi tanin cô đặc (condensed tannin) ảnh hưởng đến hình thành mêtan dạ cỏ thông qua ức chế tiêu hóa xơ (Goel và Makkar, 2012).

Các khẩu phần có cùng hàm lượng tanin nhưng khác nhau về nguồn tanin có trong khẩu phần là nguyên nhân dẫn đến hiệu quả giảm mêtan khác nhau. Jayanegara và cs. (2009) tiến hành nghiên cứu trên hai loại tannin khác nhau và đã kết luận rằng bổ sung tanin thủy phân (hydrazable tannin) từ vỏ hạt dẻ (*chestnut*) và cây thù dừ (*sumach*) vào khẩu phần đã làm giảm lượng khí mêtan thải ra lần lượt là 6,5% và 7,2%, trong khi đó, bổ sung tannin cô đặc (Condensed tannin) từ cây me riu (*quebracho*) và cây xấu hổ (*mimosa*) không làm giảm đáng kể lượng mêtan sản sinh ra thậm chí ở mức bổ sung cao nhất.

Khi hàm lượng tanin trong khẩu phần thí nghiệm tăng dần thì thể tích mêtan giảm so với thể tích mêtan ở khẩu phần đối chứng đã được nhiều nghiên cứu xác nhận. Phân tích số lớn (meta-analysis) các nghiên cứu *in vivo* với tanin của Jayanegara và cs. (2011) cho thấy có mối quan hệ khá chặt giữa nồng độ tanin và lượng mêtan tạo ra trên một đơn vị chất hữu cơ tiêu hóa. Woodward và cs. (2001) khi bổ sung 0,4% tanin từ vỏ hạt sen vào khẩu phần ăn của cừu đã làm giảm 28,5% lượng khí mêtan thải ra. Tanin như là chất bổ sung hay là loại thức ăn có tiềm năng giảm mêtan từ lên men dạ cỏ đến 20 % (Beauchemin và cs., 2006).

Khi hàm lượng tanin tăng đến 6 g/kg VCK của khẩu phần thí nghiệm thì thể tích mêtan sinh ra bị ảnh hưởng nhiều và giảm mạnh so với thể tích mêtan sinh ra ở khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có mức tanin thấp hơn cũng đã được nhiều nghiên cứu xác nhận và giải thích cơ chế. Tác động của tannin sẽ càng rõ ràng hơn khi hàm lượng của nó có trong thức ăn tăng lên (Animut và cs., 2008; Hess và cs., 2006). Một nghiên cứu gần đây ở dê cho ăn khẩu phần có chứa 5,6 g tanin tổng số/kg vật chất khô đã làm giảm hệ số phát thải mêtan mạnh (Y_m) từ 7,9 ở khẩu phần đối chứng xuống 6,0% tổng năng lượng thô ăn vào (Bhatta và cs, 2012). Tác động của tanin ngoài việc phụ thuộc vào loại tanin thì còn phụ thuộc vào mức tanin sử dụng (Goel và Makkar, 2012).

Nhằm phân tích ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau đến việc sản sinh mêtan *in vitro*, chúng tôi đã tiến hành xây dựng các phương trình hồi qui mô tả mối quan hệ giữa mêtan tạo ra và các yếu tố khẩu phần lên men *in vitro*.

Khi tìm hiểu mối quan hệ giữa lượng mêtan sinh ra, hàm lượng tanin, CF, NDF và $|a|+b$ chúng tôi có phương trình 1 và kết quả phân tích phương sai ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kết quả phân tích phương sai cho các biến của phương trình 1

Biến dự đoán	Hệ số	SE của hệ số	P
Hệ số	20,154	5,173	0,001
Tanin	-0,63057	0,08239	0,000
CF	0,4744	0,1908	0,022
NDF	-0,6658	0,1772	0,001
$ a +b$	0,17741	0,03752	0,000

Phương trình 1 có dạng như sau:

$$CH_4(ml) = 20,2 - 0,631 * Tanin + 0,474 * CF - 0,666 * NDF + 0,177 * (|a|+b);$$

$$R^2(adj) = 84.0\%, (P < 0,01).$$

Khi tìm hiểu mối quan hệ giữa lượng mêtan sinh ra, hàm lượng tanin, NDF và khí sinh ra sau 96 giờ ủ (gas 96h), chúng tôi có phương trình 2 và kết quả phân tích phương sai ở bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kết quả phân tích phương sai cho các biến của phương trình 2

Biến dự đoán	Hệ số	SE của hệ số	P
Hệ số	11,478	2,347	0,000
Tanin	- 0,56096	0,04899	0,000
NDF	- 0,21326	0,05251	0,001
Gas 96 ^h	0,21584	0,01390	0,000

Phương trình 2 là một phương trình hồi qui tuyến tính bậc nhất có dạng:

$$CH_4 (ml) = 11,5 - 0,561 * Tanin - 0,213 * NDF + 0,216 * G_{96}; R^2(adj) = 94,3\%;$$

$$(P < 0,01).$$

Qua các bảng 3.9 và 3.10 có thể thấy: Lượng mêtan sinh ra bị tác động bởi nhiều yếu tố. Trong khi tanin, NDF có ảnh hưởng âm tính (tiêu cực) đến lượng mêtan sinh ra trong điều kiện *in vitro* thì NDF và động thái ($|a|+b$) và lượng khí sinh ra (gas 96^h) lại ảnh hưởng đến mêtan sinh ra theo chiều ngược lại (tích cực và dương). Như vậy không thể chỉ giải thích lượng mêtan sinh ra trong điều kiện *in vitro* chỉ bằng một biến đơn, một yếu tố đơn lẻ. Trong nghiên cứu trước đây của Phạm Quang Ngọc và cs. (2013), các tác giả cũng có những quan sát gần tương tự như nghiên cứu này.

Theo Jayanegara và cs. (2011): Tổng tanin có quan hệ rất chặt chẽ với CH₄/chất hữu cơ tiêu hóa ($r = -0,74$; $P < 0.001$), có tương quan âm với CH₄ (-0,66) và tương quan âm với CH₄/Tổng lượng khí (-0,77). Jayanegara và cs. (2012) cho rằng khi tanin trong khẩu phần tăng thì mêtan giảm. Quan hệ giữa tannin trong khẩu phần (g/kg chất khô) và CH₄/chất hữu cơ tiêu hóa (ml/g) trong điều kiện (a) *in vitro* và (b) *in vivo* có dạng sau:

$$Y = 55,7 - 0,172 * \text{tanin} + 0,0004 * \text{tanin}^2; \quad (P < 0,001; r = 0,659; n = 91) \text{ và } Y = 46,2 - 0,123 * \text{tanin}; \quad (P = 0,036; r = 0,286; n = 30)$$

**** Quan hệ giữa hai phương pháp xác định mêtan bằng GC (Gas chromatography) và phương pháp thể tích NaOH***

Sử dụng phương pháp GC để phân tích nồng độ khí mêtan là phương pháp hiện đại có độ chính xác cao, nhưng nhược điểm là cần máy móc thiết bị đắt tiền, trong khi đó sử dụng NaOH 10M để xác định nồng độ khí mêtan là phương pháp đơn giản, rẻ tiền và không cần các công cụ và máy móc đắt tiền đồng thời cho kết quả khá chính xác (Fievez và cs., 2005). Nhằm thay thế phương pháp GC bằng phương pháp thể tích NaOH, tiến hành xây dựng phương trình hồi quy giữa hai phương pháp.

Bảng 3.11. Kết quả xác định ảnh hưởng của loại lá bổ sung và lượng tanin tổng số bổ sung đến nồng độ và thể tích khí mêtan sản sinh ra sau 96 giờ ủ bằng phương pháp GC và NaOH

Nguồn tanin	Khẩu phần	Phương pháp GC			Phương pháp NaOH		
		Nồng độ CH ₄ (%)	Thể tích CH ₄ (ml)	Giảm ml CH ₄ (%)	Nồng độ CH ₄ (%)	Thể tích CH ₄ (ml)	Giảm ml CH ₄ (%)
	ĐC	27,5^a	11,1^a	0	28,6^a	11,6^a	0
Keo dậu	KD1	27,8 ^a	9,7 ^{cb}	12,6	28,6 ^a	10,0 ^{cde}	13,79
	KD2	26,8 ^{bac}	9,4 ^{cbd}	15,3	28,5 ^{ab}	10,02 ^{cd}	13,62
	KD3	26,2 ^{bedc}	10,0 ^b	9,9	27,4 ^{abcd}	10,4 ^{bc}	10,34
	KD4	23,7 ^h	9,5 ^{cbd}	14,4	25,7 ^{efg}	10,3 ^{bc}	11,21
	KD5	22,4 ⁱ	9,3 ^{cbd}	16,2	24,0 ^{hi}	10,0 ^{cde}	13,79
	KD6	20,2 ^{kj}	7,1 ^k	36,0	22,6 ^{ij}	8,0 ^{ij}	31,03
Lá sắn	LS1	25,5 ^{fed}	9,8 ^b	11,7	26,7 ^{cdef}	10,3 ^{bc}	11,21
	LS2	25,0 ^{fg}	9,8 ^b	11,7	25,9 ^{efg}	10,2 ^c	12,07
	LS3	25,0 ^{feg}	10,7 ^a	3,6	25,4 ^{fg}	10,9 ^b	6,03
	LS4	22,1 ⁱ	9,6 ^{cb}	13,5	23,0 ^{ij}	10,0 ^{cd}	13,79
	LS5	22,5 ⁱ	9,9 ^b	10,8	22,7 ^{ij}	10,0 ^{cd}	13,79
	LS6	20,6 ^j	7,8 ^{ihj}	29,7	21,6 ^{kj}	8,0 ^{hij}	31,03
Lá chè đại	CD1	26,9 ^{ba}	7,5 ^{ikj}	32,4	28,3 ^{ab}	7,9 ^{ij}	31,90
	CD2	26,2 ^{fbedc}	8,0 ^{ihg}	27,9	27,8 ^{abc}	8,5 ^{hij}	26,72
	CD3	25,6 ^{fedc}	8,0 ^{ihg}	27,9	27,9 ^{abc}	8,7 ^{fgh}	25,00
	CD4	24,2 ^{hg}	7,9 ^{ihg}	28,8	26,1 ^{d^{egf}}	8,6 ^{ghi}	25,86
	CD5	23,1 ^{hi}	8,1 ^{ihg}	27,0	25,5 ^{fg}	9,0 ^{fg}	22,41
	CD6	22,4 ⁱ	5,9 ^l	46,8	24,9 ^{gh}	6,6 ^k	43,10
Tanin tinh khiết	TN1	26,3 ^{bdc}	9,1 ^{ced}	18,0	27,1 ^{bcde}	9,4 ^{def}	18,97
	TN2	25,4 ^{fed}	8,9 ^{fed}	19,8	26,6 ^{cdef}	9,3 ^{ef}	19,83
	TN3	24,2 ^{hg}	8,6 ^{feg}	22,5	25,6 ^{fg}	9,1 ^{fg}	21,55
	TN4	22,4 ⁱ	8,3 ^{fhg}	25,2	23,6 ^{hi}	8,8 ^{fgh}	24,14
	TN5	19,3 ^{kl}	7,2 ^{kj}	35,1	20,6 ^{kl}	7,7 ^j	33,62
	TN6	18,7 ^l	5,4 ^l	51,4	19,7 ^l	5,7 ^l	50,86
	SEM	0,25	0,08		0,34	0,08	

Các giá trị trung bình trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Khuynh hướng chung là hàm lượng tanin tăng từ 1 đến 5 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì thể tích mêtan (GC) giảm so với thể tích mêtan ở khẩu phần đối chứng (thể tích mêtan biến động nhưng không có qui luật), có sự sai khác về thể tích mêtan sinh ra từ các khẩu phần ở cùng mức tanin ($P < 0,05$). Tuy nhiên khi hàm lượng tanin tăng đến 6 g/kgVCK của khẩu phần thí nghiệm thì thể tích mêtan (GC) sinh ra bị ảnh hưởng nhiều và giảm mạnh so với thể tích mêtan (GC) sinh ra ở khẩu phần đối chứng và các khẩu phần có mức tanin thấp hơn ($P < 0,05$).

Ở đây 89 cặp số liệu từ thí nghiệm này và số liệu từ một thí nghiệm khác của nhóm nghiên cứu đã công bố (Manh và cs., 2012) được sử dụng. Đầu tiên chúng tôi phân tích phương sai thứ bậc để xem mối quan hệ này có thể biểu diễn về mặt toán học như thế nào (Bảng 3.12) và được minh họa qua Hình 3.6 và 3.7.

Bảng 3.12. Kết quả phân tích phương sai thứ bậc cho các loại phương trình

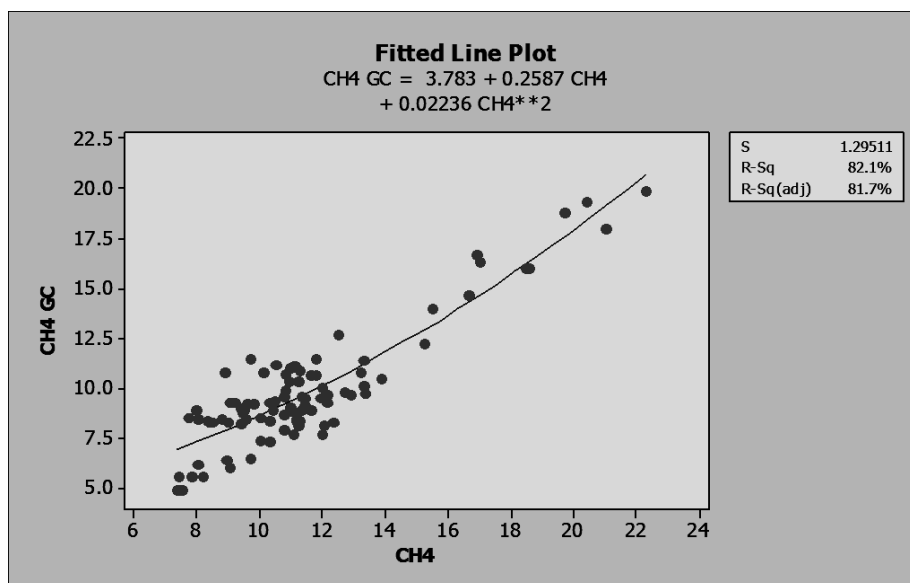
Nguồn biến động	Bậc tự do – DF	Tổng bình phương –SS	F	P
Phương trình tuyến tính	1	653,660	373,22	0,001
Phương trình bậc hai	1	8,122	4,84	0,030
Phương trình bậc ba	1	0,016	0,01	0,923

Trong trường hợp hồi qui tuyến tính, phương trình có dạng:

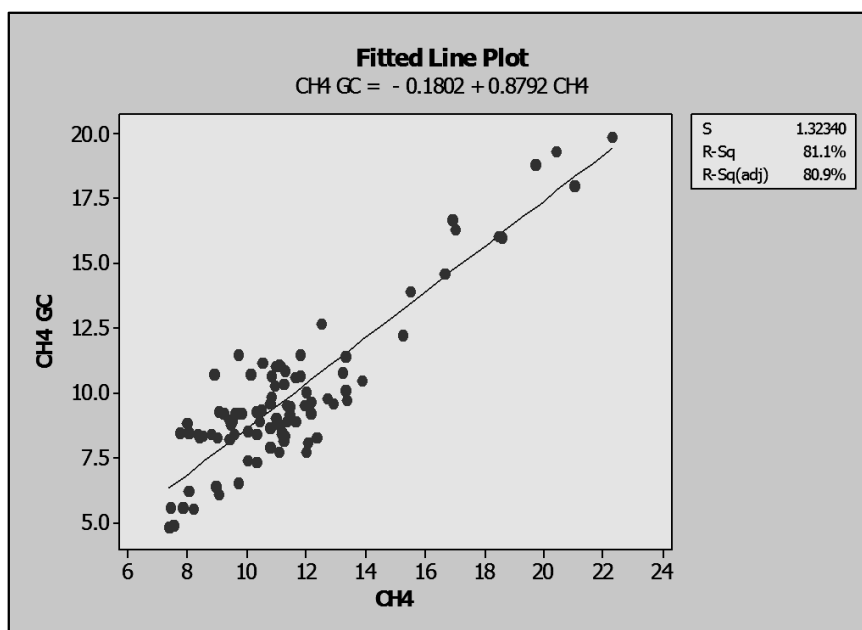
$$CH_4 \text{ (GC- ml)} = - 0,1802 + 0,8792 * CH_4 \text{ (NaOH-ml)}; R^2(\text{adj}) = 80,9\%; P < 0,01.$$

Trong trường hợp bậc hai, phương trình có dạng:

$$CH_4 \text{ (GC- ml)} = 3.783 + 0,2587 * CH_4 \text{ (NaOH-ml)} + 0,02236 * CH_4 \text{ (NaOH-ml)}^2; R^2(\text{adj}) = 81.7\%; P < 0.01.$$



Hình 3.6. Phương trình bậc hai mô tả quan hệ giữa lượng CH_4 xác định bằng phương pháp GC và phương pháp thể tích NaOH



Hình 3.7. Phương trình hồi qui tuyến tính bậc nhất tả quan hệ giữa lượng CH_4 xác định bằng phương pháp GC và phương pháp thể tích NaOH

Kết quả cho thấy quan hệ giữa hai phương pháp có thể biểu diễn tốt nhất bằng một phương trình tuyến tính ($P = 0,001$). Quan hệ này cũng có thể biểu diễn ở mức chấp nhận được bằng một phương trình bậc 2 ($P = 0,030$). Tuy nhiên, mối quan hệ này không thể biểu diễn dưới dạng một phương trình bậc 3 ($P = 0,923$).

3.2.6. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung (nguồn tanin) trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro*

Vì các mức tanin ở cả bốn khẩu phần được bố trí ở sáu mức tương tự nhau nên về nguyên lý có thể gộp các số liệu để xem xét ảnh hưởng của nguồn tanin. Khi gộp các số liệu lại thì mức tanin trung bình là 3,5-3,6 g/kg VCK của khẩu phần. Kết quả tính toán ảnh hưởng của nguồn tanin được trình bày ở Bảng 3.13.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của loại lá bổ sung (nguồn tanin) trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro*

Chỉ số	Loại lá						Tannin tinh khiết	SEM
	Keo đậu	Lá sắn	Chè đại	Lá chè	Keo tai tượng	Keo lá trà		
1. CH ₄	9,17 ^a	9,60 ^a	7,57 ^b	7,617	8,283	8,417	7,92 ^b	0,43
2. Giảm (%)	17,39	13,51	31,80	31,38	25,38	24,17	28,65	
3. DMD	47,70 ^a	51,32 ^a	43,00 ^b	29,65 ^c	43,32 ^{ab}	45,62 ^{ab}	48,32 ^a	1,58
4. OMD	49,23 ^a	52,05 ^a	43,97 ^b	30,63 ^c	44,45 ^{ab}	45,30 ^{ab}	48,05 ^a	1,35
5. Gas 96 ^h	37,50 ^a	41,07 ^a	30,72 ^c	33,28	35,20	35,45	34,73 ^b	1,23
6. a +b	45,77 ^a	45,20 ^a	39,83 ^c	37,62 ^{cb}	42,23 ^a	39,40 ^{ab}	43,40 ^b	1,29
7. ME	7,59 ^a	7,77 ^a	6,16 ^b	6,38 ^b	6,92 ^a	6,50 ^b	6,33 ^b	0,16
8. SCFA	0,56 ^a	0,63 ^a	0,41 ^b	0,442 ^b	0,547 ^a	0,475 ^b	0,45 ^b	0,02

Ghi chú: 1: ml/200mg VCK khẩu phần; 2: % so với đối chứng; 3 và 4: %; 5: Khí sinh ra sau 96 h ủ (ml/200mg VCK khẩu phần); 6: ml/200 mg VCK khẩu phần; 7: MJ/kg VCK; 8: mmol/200mg VCK khẩu phần; Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Kết quả ở bảng cho thấy: Hiệu quả giảm mêtan *in vitro* của tanin trong chè đại, lá chè và tanin tinh khiết mạnh hơn hiệu quả này ở keo đậu, lá sắn,

keo tai tượng và keo lá trà (31,8; 31,38 và 28,65 so với 17,39; 13,51; 25,38 và 24,17 %). Nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hiệu quả này ($P>0,05$).

Tuy nhiên, tanin trong chè đại ảnh hưởng tiêu cực nhiều nhất và làm giảm DMD, OMD, khí sinh ra sau 96 h ủ *in vitro*, các thông số a, b, ($|a|+b$), ME và SCFA ($P<0,05$). Tanin tinh khiết cũng ảnh hưởng tiêu cực nhưng ít hơn và chỉ làm giảm khí sinh ra sau 96 h ủ *in vitro*, các thông số a, b, ($|a|+b$, c, ME và SCFA ($P<0,05$).

Như vậy nguồn tanin đã có ảnh hưởng rất khác nhau đến lượng mêtan sinh ra và lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro*. Về tổng thể khi xem xét cả lượng mêtan sinh ra và lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro* thì tanin từ lá keo dậu và lá sắn tốt hơn tanin tinh khiết, tanin từ lá chè đại kém nhất về hiệu quả tổng hợp.

Theo Waghorn (2008); Goel và Makkar (2012), ảnh hưởng của tanin là có điều kiện và phụ thuộc vào thành phần của nó. Còn theo Pellikaan và cs. (2011), lượng khí sinh ra trong điều kiện *in vitro* và lượng mêtan tạo ra phụ thuộc vào đặc tính của tanin như loại tanin (condensed hay ellagitannins hay gallotannins), độ hòa tan của tanin...

Theo Goel and Makkar (2012), ảnh hưởng giảm thiểu mêtan của tanin có tương quan thuận với số lượng nhóm hydroxyl trong cấu trúc của nó. Hydrolyzable tanin (tanin thủy phân) có xu hướng tác động trực tiếp làm ức chế vi khuẩn sinh mêtan ở dạ cỏ (rumen metanogens) trong khi tanin cô đặc (condensed tanin) ảnh hưởng đến hình thành mêtan dạ cỏ thông qua ức chế tiêu hóa xơ.

3.2.7. Ảnh hưởng của mức tanin trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro*

Khi không quan tâm đến nguồn tanin nữa mà chỉ quan tâm đến mức tanin trong khẩu phần chúng tôi đã tính ảnh hưởng của tanin ở 6 mức trên tất cả bốn loại khẩu phần để so sánh. Kết quả tính toán được trình bày ở bảng 3.14.

Kết quả ở bảng cho thấy bắt đầu từ liều tanin 4,0 - 5g/kgVCK khẩu phần, lượng khí mêtan đã giảm khá mạnh (20,5 và 22,3% so với khẩu phần đối chứng). Tuy nhiên liều 6,0 g/kgVCK khẩu phần có tác dụng giảm mêtan mạnh nhất. Song ở liều tanin này DMD và OMD, lượng khí sinh ra sau 96 giờ, thông số b và (|a|+b) cũng giảm mạnh ($P<0,05$) chứng tỏ lên men và tiêu hóa thức ăn đã bị ảnh hưởng nhiều. Kết quả là ở mức tanin 6,0 g/kgVCK khẩu phần giá trị ME và SCFA giảm đáng kể ($P<0,05$).

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của mức tanin (g/kg VCK) trong khẩu phần thí nghiệm đến lượng mêtan sinh ra, lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro*

Chỉ số	Mức tannin						SEM
	1	2	3	4	5	6	
1. CH ₄	9,83 ^a	9,20 ^{ab}	8,73 ^{bc}	7,93 ^{cd}	7,003 ^e	5,68 ^f	0,25
2. Giảm (%)	11,49 ^{ef}	17,12 ^{de}	21,40 ^{cd}	28,61 ^{bc}	36,94 ^b	48,87 ^a	2,23
3. CH ₄	109,43	102,75	101,12	102,3	94,4	88,1	10,77
4. Giảm (%)	9,90	15,40	16,75	15,7	22,3	27,4	8,86
5. DMD	45,17	45,08	44,18	41,35	40,45	34,13	4,23
6. OMD	46,83	46,35	43,83	40,80	39,95	34,90	3,96
7. Gas 96	37,23 ^a	36,30 ^{ab}	35,55 ^{ab}	34,80 ^{ab}	33,70 ^{bc}	30,43 ^{bc}	0,92
8. a+b	43,43	40,758	41,97	41,07	40,74	35,998	1,49
9. ME	6,75	6,57	6,63	6,50	6,49	6,15	0,17
10. SCFA	0,523	0,508	0,490	0,473	0,468	0,410	0,03

Ghi chú: 1: ml CH_4 /200mg VCK khẩu phần; 2: % so với đối chứng; 3: lít CH_4 /1kg chất khô tiêu hóa được của khẩu phần 4: % so với đối chứng; 5: %; 6: %; 7: Khí sinh ra sau 96 h ủ (ml/200mg chất khô), 8: Tiềm năng sinh khí (ml); 9: MJ/kg chất khô; 10: mmol/200mg chất khô của khẩu phần; Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Theo Goel và Makkar (2012), ảnh hưởng giảm thiểu mêtan của tanin phụ thuộc vào tỷ lệ sử dụng. Một nghiên cứu gần đây ở dê cho thấy khẩu phần có chứa 5,6g tanin tổng số/kg DM đã làm giảm hệ số phát thải mêtan từ (Y_m) 7,9 (khẩu phần đối chứng xuống) xuống 6,0 % tổng năng lượng thô ăn vào (Bhatta và cs., 2012). Theo Goel và Makkar (2012), ảnh hưởng giảm thiểu mêtan của tanin phụ thuộc vào tỷ lệ sử dụng.

Thường các kết quả đều thấy rằng tỷ lệ tanin cao hơn 5% trong khẩu phần có ảnh hưởng xấu đến khả năng sử dụng dinh dưỡng và sức sản xuất của động vật (Waghorn, 2008). Trong điều kiện *in vitro*, khi bổ sung 20% *Biophytum petersianum* (có 4,3% tanin) và *Sesbania grandiflora* (có 1,9% tanin) vào chất nền đã làm giảm lần lượt từ 17 – 25% và 9,2 -10,3% lượng mêtan thải ra mà không ảnh hưởng đến tỷ lệ tiêu hóa chất khô (Hariadi và Santoso, 2010). Trong điều kiện *in vivo*, Grainger và cs. (2009a) đã bổ sung hai mức tanin (8,6 và 14,6 g/kg VCK chất khô ăn vào) được tách chiết từ *Acacia mearnsii* đưa vào khẩu phần của bò sữa chần thả ăn 4,5 kg thức ăn tinh đã làm giảm thiểu 11,5 và 28% mêtan thải ra, nhưng cũng làm giảm tỷ lệ tiêu hóa của khẩu phần.

Như vậy lượng tanin bổ sung đã có ảnh hưởng rất khác nhau đến lượng mêtan sinh ra và lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro*. Về tổng thể khi xem xét cả lượng mêtan sinh ra và lên men, tiêu hóa dạ cỏ trong điều kiện *in vitro* thì mức tanin 5% tốt nhất về hiệu quả tổng hợp.

3.3. ẢNH HƯỞNG CỦA BỔ SUNG NGỌN LÁ CÂY KEO DẬU VỚI CÁC TỶ LỆ KHÁC NHAU TRONG KHẤU PHẦN ĐẾN TỶ LỆ TIÊU HÓA, NITƠ TÍCH LŨY VÀ LƯỢNG MÊTAN PHÁT THẢI Ở BÒ LAI SIND SINH TRƯỞNG

3.3.1. Tỷ lệ tiêu hóa *in vivo* các thành phần dinh dưỡng có trong khẩu phần

Để đánh giá khả năng tiêu hóa của khẩu phần, các cá thể bò được lấy mẫu thức ăn cho ăn, thức ăn thừa, phân và nước tiểu trong 7 ngày liên tục theo qui trình của Cochran và Galyean (1994), Burns và Pond (1994). Kết quả thu được được trình bày ở Bảng 3.15.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu đến tỷ lệ tiêu hóa *in vivo*

Chỉ tiêu	KP1 (ĐC)	KP2	KP3	KP4	SEM
Tỷ lệ tiêu hóa (%)					
Vật chất khô	61,23 ^a	60,86 ^a	57,18 ^b	58,56 ^{ab}	1,41
Protein	69,8 ^a	71,99 ^a	59,76 ^b	60,48 ^b	1,17
Mỡ thô	69,29 ^a	73,27 ^a	54,74 ^b	49,23 ^b	1,80
Xơ thô	57,37	58,30	56,12	58,55	1,49
NDF	43,78	42,76	45,41	42,09	2,19
ADF	53,54	53,55	49,98	49,13	5,58
Tro	40,11	39,68	43,36	43,46	2,36
Chất hữu cơ	63,44 ^a	63,05 ^a	58,79 ^b	60,34 ^b	1,33

Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Số liệu Bảng 3.15 cho thấy, tỷ lệ tiêu hóa chất khô, protein thô, mỡ thô và chất hữu cơ có sự sai khác về thống kê ($P < 0,05$) khi so sánh giữa khẩu phần đối chứng (KP1); KP2 với KP3 và KP4. Trong khi đó, tỷ lệ tiêu hóa xơ

thô, NDF, ADF và khoáng tổng số lại không thấy có sự sai khác về thống kê ($P>0,05$) khi so sánh giữa khẩu phần đối chứng (KP1); KP2 với KP3 và KP4.

Nghiên cứu trong điều kiện *in vivo* của Grainger và cs (2009a) khi bổ sung hai mức tanin (8,6 và 14,6 g/kg chất khô ăn vào) được tách chiết từ *Acacia mearnsii* vào khẩu phần của bò sữa chần thả ăn 4,5 kg thức ăn tinh cho thấy, việc bổ sung này đã làm giảm thiểu 11,5 và 28% metan phát thải, nhưng cũng làm giảm tỷ lệ tiêu hóa của khẩu phần. Một số nghiên cứu khác cho rằng tanin tách chiết và các cây chứa tanin làm giảm tỷ lệ tiêu hóa trong cả *in vitro* (Bhatta và cs., 2009; Patra và cs., 2006) và *in vivo* (Animut và cs., 2008).

Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của Jetana và cs. (2011) cho thấy bổ sung keo đậu làm tăng tiêu hóa xơ ở bò. Lý do có thể là protein thô trong keo đậu đã ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật và tiêu hóa nitơ trong dạ cỏ. Traore và cs. (2010) cho rằng, tỷ lệ tiêu hóa thức ăn và hoạt động của vi sinh vật dạ cỏ được cải thiện khi bổ sung protein thô phân giải ở dạ cỏ, làm tăng tỷ lệ tiêu hóa và tiêu hóa thức ăn nhanh hơn dẫn đến giảm độ choán dạ cỏ từ đó làm tăng lượng thức ăn ăn vào.

3.3.2. Cân bằng nitơ ở bò được cho ăn các khẩu phần thí nghiệm

Số liệu bảng 3.16 cho thấy kết quả tính toán cân bằng nitơ (N) ở bò khi cho ăn các khẩu phần khác nhau.

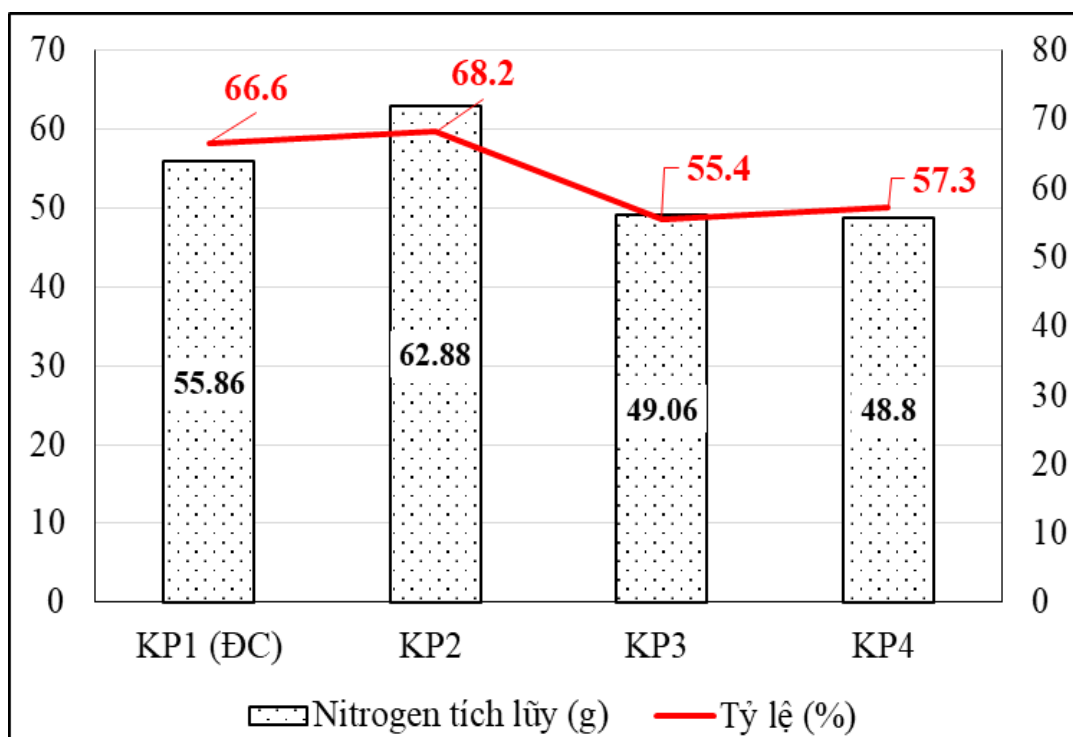
Lượng nitơ ăn vào dao động từ 83,86 – 92,24 g, cao nhất ở nhóm bò ăn KP2 và thấp nhất thấy ở nhóm bò ăn KP1 đồng thời có sự sai khác có ý nghĩa giữa các lô thí nghiệm ($P<0,05$). Nhìn chung lượng nitơ ăn vào và thải ra ở bò ăn khẩu phần bổ sung lá keo đậu có xu hướng cao hơn so bò ăn khẩu phần đối chứng. Tuy nhiên, lượng nitơ tích lũy lại thấy cao nhất ở bò ăn KP2 là 62,88 g (chiếm tỷ lệ 68,2% lượng thu nhận), tiếp đến là bò ăn KP1 giá trị này là 55,86 g/ngày (chiếm tỷ lệ 66,6% lượng thu nhận) trong khi đó nitơ tích lũy ở bò ăn

KP3 và KP4 chỉ đạt 49,06 và 48,8 g chiếm tỷ lệ tương ứng 55,4 và 57,3% lượng nitơ thu nhận (hình 3.8)

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ ngọn lá cây keo dậu đến cân bằng nitơ (g/ngày)

Chỉ tiêu	KP1 (ĐC)	KP2	KP3	KP4	SEM
Nitơ ăn vào	83,86 ^b	92,24 ^a	88,48 ^{ab}	85,14 ^{ab}	1,01
– Tỷ lệ (%)	100	100	100	100	
Nitơ thải ra	28,02 ^b	29,38 ^b	39,38 ^a	36,34 ^a	0,83
– Tỷ lệ (%)	33,4	31,9	44,5	42,7	
Nitơ tích lũy	55,86 ^{ab}	62,88 ^a	49,06 ^b	48,8 ^b	1,05
– Tỷ lệ (%)	66,6	68,2	55,4	57,3	

Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).



Hình 3.8. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ ngọn lá cây keo dậu đến lượng nitơ tích lũy

Mặc dù về lý thuyết, các cây lá họ đậu giàu N làm tăng trao đổi N ở dạ

cỏ, phân giải protein ở dạ cỏ lại bị ảnh hưởng bởi hàm lượng tanin có trong lá. Ảnh hưởng của tanin có thể thấy thông qua hàm lượng amoniac thấp trong dạ cỏ (Carulla và cs., 2005; Tiemann và cs., 2008). Đã thấy là tanin làm giảm phân giải protein trong dạ cỏ vì nó làm cho protein ít bị phân giải ở dạ cỏ hơn bởi vi sinh vật (Reed, 1995; Mueller-Harvey, 2006). Khi N ít bị phân giải dạ cỏ bổ sung các loại lá giàu N, lượng N từ khẩu phần xuống dạ múi khế tăng lên và do đó lượng axit amin thiết yếu hấp thu tại ruột non có thể cũng tăng lên (Ben Salem và cs., 2005; Ramírez-Restrepo và Barry, 2005; Hess và cs., 2008).

Trong thí nghiệm này, với bò ăn KP3 và KP4 là khẩu phần có tỷ lệ tanin cao hơn có thể gây kháng dinh dưỡng ảnh hưởng đến khả năng hấp thu từ đó ảnh hưởng tới giá trị nitơ tích lũy. Hiệu quả sử dụng các thành phần dinh dưỡng và cân bằng N có xu hướng được cải thiện khi bò được cho khẩu phần bổ sung liều lượng tanin từ lá keo đậu phù hợp với tỷ lệ 0,3% tương ứng với 20% vật chất khô của khẩu phần.

3.3.3. Lượng khí mêtan phát thải

Việc xác định tổng khí mêtan sản sinh (l/con/ngày) được xác định thông qua hệ thống phân tích khí mêtan gắn với buồng hô hấp. Hàng tháng, mỗi con bò được đưa vào buồng hô hấp 01 ngày để xác định tổng lượng khí mêtan sản sinh. Lượng khí mêtan sản sinh trên mỗi kg tăng khối lượng cũng được tính toán khi bò được ăn khẩu phần khác nhau. Kết quả về ảnh hưởng của khẩu phần ăn đến lượng mêtan thải ra được trình bày ở Bảng 3.17.

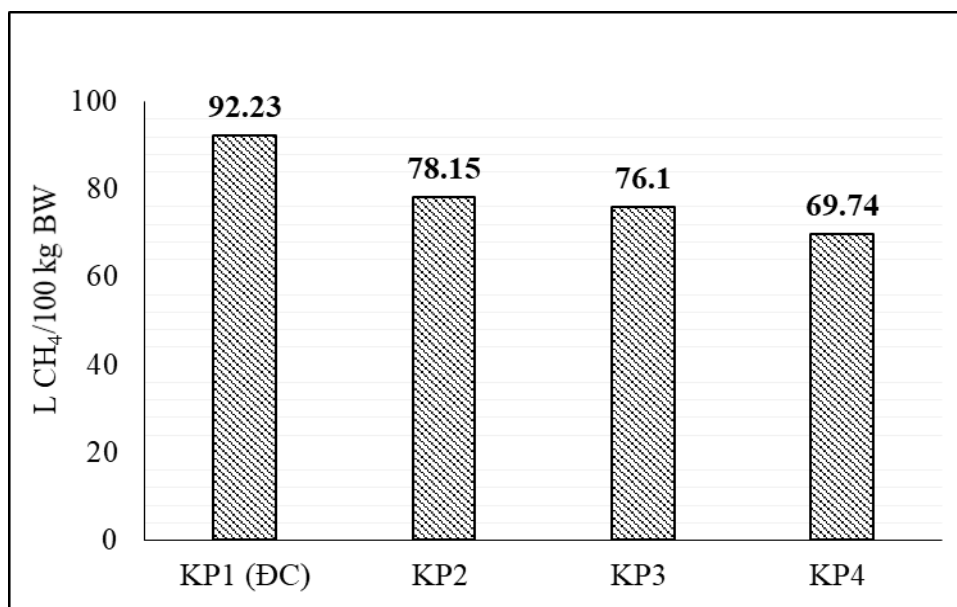
Số liệu thu được ở Bảng 3.17 cho thấy lượng mêtan sản sinh (l/con/ngày) dao động từ 114,5 – 149,6 lít tùy thuộc vào khẩu phần và có sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa nhóm bò ăn KP3; KP4 so với nhóm ăn KP1 và KP2. Nhìn chung, lượng mêtan có xu hướng giảm đáng kể khi bổ

sung tanin từ keo dậu, xu hướng này cũng thấy khi lượng khí mêtan sản sinh tính trên 100 kg khối lượng cơ thể và trên 1 kg khối lượng trao đổi (Hình 3.9 và 3.10)

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến khí CH_4 sản sinh

Chỉ tiêu	KP1 (ĐC)	KP2	KP3	KP4	SEM
V CH_4 (l/con/ngày)	149,6 ^a	133,7 ^a	114,5 ^b	131,1 ^{ab}	2,78
L CH_4 /100 kg BW	92,23 ^a	78,15 ^{ab}	76,10 ^b	69,74 ^b	4,83
V CH_4 (l/kg BW ^{0.75})	3,31 ^a	2,87 ^{ab}	2,57 ^b	2,81 ^{ab}	0,08

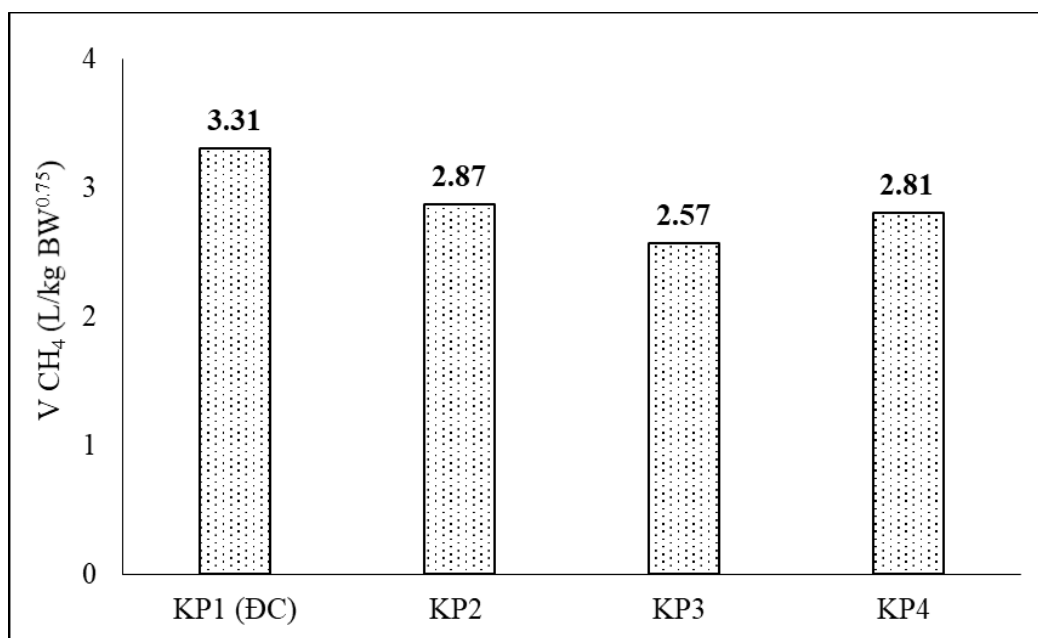
Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$);



Hình 3.9. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến khí mêtan phát thải tính trên 100 kg khối lượng cơ thể

Thí nghiệm trong điều kiện *in vitro* của Hariadi và Santoso, (2010), khi bổ sung 20% *Biophytum petersianum* (có 4,3% tanin) và *Sesbania grandiflora* (có 1,9% tanin) vào chất nền đã làm giảm lần lượt từ 17 – 25% và 9,2 -10,3% lượng mêtan thải ra. Trong điều kiện *in vivo*, Grainger và cs. (2009) đã bổ sung hai mức tanin (8,6 và 14,6 g/kg chất khô ăn vào) được

tách chiết từ *Acacia mearnsii* vào khẩu phần của bò sữa chăn thả ăn 4,5 kg thức ăn tinh, kết quả cho thấy việc bổ sung đã làm giảm thiểu tương ứng là 11,5 và 28% mêtan thải ra.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu lượng đến khí mêtan phát thải trên 1 kg khối lượng trao đổi

3.4. KHẢ NĂNG TĂNG KHỐI LƯỢNG, HIỆU QUẢ SỬ DỤNG THỨC ĂN, PHÁT THẢI KHÍ MÊTAN VÀ HIỆU QUẢ KINH TẾ CỦA BÒ LAI SIND SINH TRƯỞNG KHI ĂN KHẨU PHẦN BỔ SUNG NGỌN LÁ KEO DẬU VỚI CÁC TỶ LỆ KHÁC NHAU

3.4.1. Lượng thức ăn thu nhận của bò thí nghiệm

Lượng thức ăn thu nhận của các nhóm bò nuôi bằng các khẩu phần khác nhau được trình bày trong Bảng 3.18.

Kết quả cho thấy lượng chất khô ăn vào dao động từ 4,11 - 4,21 kg, cao nhất ở nhóm bò ăn KP2 và thấp nhất thấy ở nhóm bò ăn KP4. Lượng thức ăn ăn vào có xu hướng giảm dần khi tăng tỷ lệ bột lá keo dậu trong khẩu phần, mặc dù khác nhau về giá trị nhưng không thấy có sự sai khác về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Bảng 3.18. Lượng thu nhận thức ăn của bò nuôi với các khẩu phần có bổ sung các mức tanin khác nhau từ ngọn lá cây keo dậu

Chỉ tiêu	KP1	KP2	KP3	KP4	SEM
Tháng 1					
VCK ăn vào (kg/con/ngày)	3,80	3,90	3,78	3,70	0,05
VCK (kg/BW ^{0.75})	8,31	8,45	8,22	8,00	0,09
VCK (kg/100 kg BW)	2,32	2,36	2,29	2,23	0,02
Tháng 2					
VCK ăn vào (kg/con/ngày)	4,04	4,03	3,97	4,12	0,04
VCK (kg/BW ^{0.75})	8,14	7,96	7,91	8,30	0,08
VCK (kg/100 kg BW)	2,21	2,26	2,15	2,15	0,02
Tháng 3					
VCK ăn vào (kg/con/ngày)	4,51	4,68	4,62	4,50	0,04
VCK (kg/BW ^{0.75})	8,40	8,54	8,34	8,42	0,07
VCK (kg/100 kg BW)	2,23	2,25	2,19	2,24	0,02
Cả giai đoạn					
VCK ăn vào (kg/con/ngày)	4,12	4,21	4,13	4,11	0,04
VCK (kg/BW ^{0.75})	8,23	8,30	8,05	8,20	0,07
VCK (kg/100 kg BW)	2,24	2,24	2,17	2,23	0,02

Ghi chú: VCK: vật chất khô; BW: khối lượng; BW^{0.75}: khối lượng trao đổi

Lượng chất khô ăn thức ăn vào tính trên 100 kg khối lượng cơ thể biến động từ 2,17-2,24 kg thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Preston và Willis (1967) trên bò tơ (200 kg) lượng chất khô thu nhận xấp xỉ từ 2,8-3 kg tính trên 100 kg khối lượng cơ thể. Theo Kumar và Vaithiyannathan, (1990), lượng thức ăn ăn vào của bò thịt có khuynh hướng giảm khi tăng lượng tanins trong khẩu phần. Makkar và cs. (1995) cho biết việc giảm lượng ăn vào có thể bởi ba lý do: (i) thức ăn kém ngon miệng do việc kết hợp tanin với protein nước bọt; (ii) tanin làm se hoặc chất miệng, chướng hơi do giảm tỷ lệ tiêu hóa

chất khô và (iii) sự bám dính tanin với ruột non dẫn đến đáp ứng của hormone. Theo kết quả nghiên cứu của Makkar (2003), gia súc giảm lượng ăn vào khi tanin trong khẩu phần $\geq 3\%$. Trong nghiên cứu này, mức tanin là 0,3-0,5% VCK khẩu phần và tỷ lệ này không ảnh hưởng đến lượng chất khô thu nhận. Kết quả này phù hợp với những báo cáo của Alves và cs. (2006), đã không tìm thấy ảnh hưởng của việc sử dụng tanin trong khẩu phần đến lượng vật chất khô ăn vào.

Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này khác với một số nghiên cứu trước đây. Lượng thức ăn thực vật nhiệt đới ăn vào có chứa tanin ở nồng độ vừa phải (3-6% chất khô) giúp cải thiện dinh dưỡng ăn vào ở gia súc nhai lại, đặc biệt là vật chất khô, chất hữu cơ và protein (Kumar và Singh, 1984). Bổ sung 27% keo đậu vào khẩu phần của cừu giúp tăng lượng vật chất khô và chất hữu cơ thu nhận (Denia và cs., 2013). Tương tự, Wahyuni và cs. (1982) quan sát thấy lượng chất khô ăn vào tăng thêm 30% khi sử dụng 60% keo đậu trong khẩu phần so với đối chứng.

3.4.2. Khả năng tăng khối lượng của bò thí nghiệm

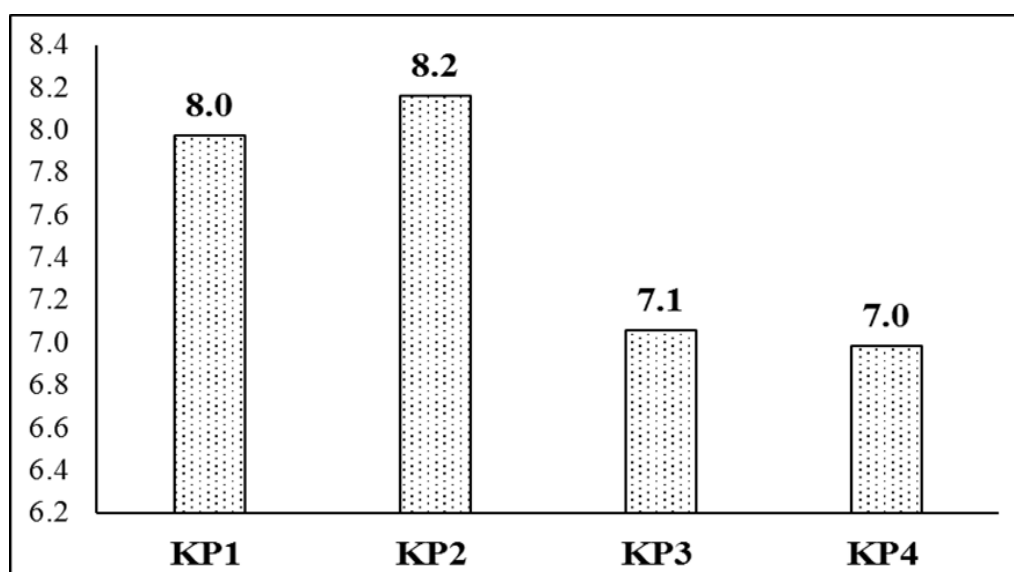
Khối lượng và tăng khối lượng của bò thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.19 và minh họa qua Hình 3.11 và 3.12.

Kết quả ở Bảng 3.19 cho thấy: Tăng khối lượng bình quân sau một tháng thí nghiệm đạt từ 497 - 677g/con/ngày, cao nhất ở nhóm bò ăn khẩu phần bổ sung 20% bột lá keo đậu (KP2) và thấp nhất ở nhóm bò ăn khẩu phần bổ sung 30% bột lá keo đậu (KP4) và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Đến tháng thứ 2 và tháng 3, tăng khối lượng bình quân hàng ngày cao nhất vẫn là nhóm bò ăn khẩu phần (KP2) đạt tương ứng là 747 và 627 g/con/ngày và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với giá trị này ở bò nuôi các khẩu phần khác.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu đến khối lượng bò qua các tháng thí nghiệm

Chỉ tiêu	KP1	KP2	KP3	KP4	SEM
K.lượng ban đầu (kg)	157,1	157,7	157,2	158,9	2,19
K.lượng tháng 1 (kg)	177,3	178,0	172,6	173,8	2,58
• Tăng KL1 (g/con/ngày)	673,26 ^a	677,74 ^a	513,64 ^b	497,48 ^b	16,59
K.lượng tháng 2 (kg)	198,0 ^{ab}	200,4 ^a	192,4 ^b	193,8 ^{ab}	3,32
• Tăng KL2 (g/con/ngày)	690,14 ^{ab}	747,38 ^a	660,62 ^b	667,94 ^b	27,42
K.lượng tháng 3 (kg)	216,7 ^{ab}	219,2 ^a	208,9 ^b	210,5 ^b	3,53
• Tăng KL3 (g/con/ngày)	623,14 ^b	627,88 ^a	550,02 ^b	557,42 ^b	19,37
• Tăng KL cả kỳ (g/con/ngày)	662,52 ^a	683,34 ^a	574,44 ^b	573,94 ^b	22,11

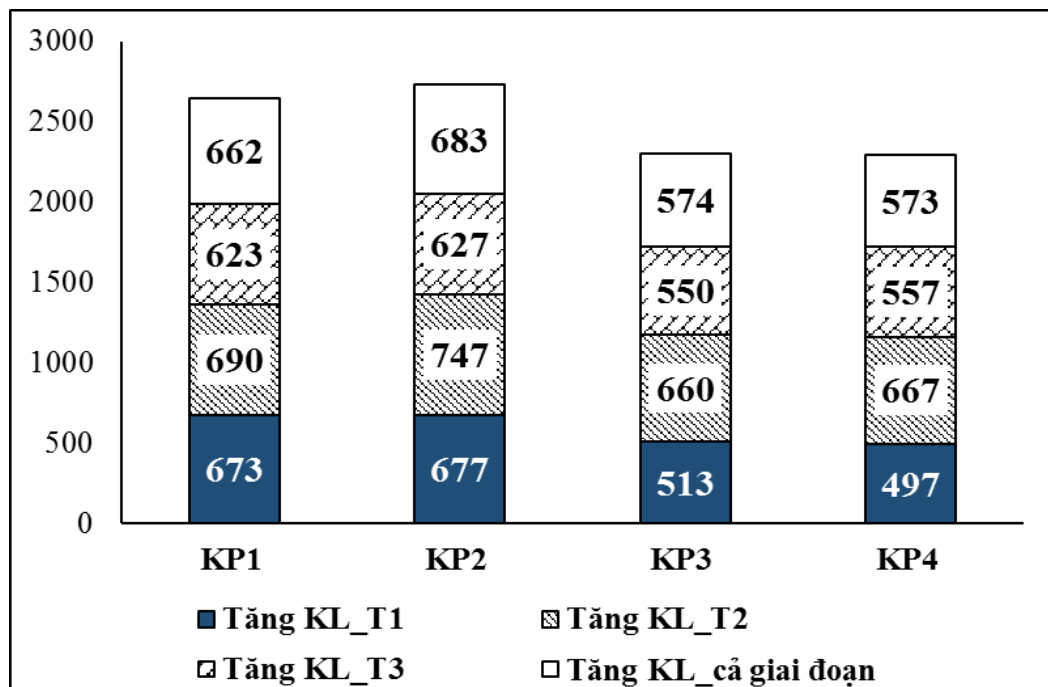
Ghi chú: Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); K.lượng: khối lượng; KL: khối lượng



Hình 3.11. Sinh trưởng tương đối (%) của bò thí nghiệm

Tính chung cho cả giai đoạn thí nghiệm, tăng khối lượng bình quân hàng ngày đạt cao nhất ở nhóm bò ăn khẩu phần KP2 (683g/con/ngày) trong khi đó giá trị này ở bò ăn các khẩu phần: KP1 (đối chứng); KP3 và KP4 lần lượt là 662; 574 và 573g/con/ngày (Hình 2) và có sự sai khác có ý

nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Kết quả này cũng được thể hiện qua sinh trưởng tương đối của các nhóm bò ăn các khẩu phần khác nhau trong giai đoạn thí nghiệm theo thứ tự từ cao xuống thấp đó là KP2, KP1, KP3 và KP4 tương ứng 8,2; 8,0; 7,1 và 7,0% (Hình 3.11)



Hình 3.12. Sinh trưởng tuyệt đối (g/con/ngày) của bò thí nghiệm

Trong một thí nghiệm của Virapol Jamsawat và cs. (2010) trên bò tơ Holstein Friesian được cho ăn: 1 (T1) Cỏ para (đối chứng), 2 (T2): Cỏ para + Sắn lát, 3 (T3) cỏ para + Lá keo dậu, 4 (T4) cỏ para + Lá keo dậu + sắn lát, kết quả cho thấy nghiệm thức T4 cho tăng khối lượng cao nhất: 0,56 kg/ngày, tiếp theo là T3: 0,54 kg/ngày, T2: 0,53 kg/ngày và T1: 0,42 kg/ngày. Herawaty và cs (2013) thí nghiệm trên bò đực lai Ongole có khối lượng $175 \pm 10,53$ kg được cho ăn: (A) Cỏ + thức ăn tinh, (B) Rơm+thức ăn tinh (C) Rơm+thức ăn tinh + 0.5% *S. cerevisiae* và (D) Rơm+thức ăn tinh + 0.5% *S. cerevisiae* +15% keo dậu. Tỷ lệ tiêu hóa DM của (B) đạt 61,03% thấp hơn của (A), (C) và (D) tương ứng là 68,05; 63,01 và 68,15%. Khẩu phần có cùng protein thô 11-13%, TDN tương tự cho thấy bổ sung *S. cerevisiae* và có keo

dậu (D) tăng khối lượng cao (775,7 g/ngày). Agastin và cs. (2012) nghiên cứu trong 12 tháng vỗ béo 309 bò đực Creole steers (khối lượng 173 ± 3 kg và 252 ngày tuổi) được chia ra (1) bò vỗ béo nuôi nhốt tại chuồng được ăn cỏ cắt và thức ăn tinh; (2) Bò chăn thả không bổ sung gì, kết quả cho thấy tăng khối lượng bò vỗ béo nuôi nhốt đạt 786 g/con/ngày trong khi đó bò chăn thả chỉ đạt 517 g/con/ngày. Rahman và cs. (1990) bê cho ăn lá keo đậu có thể có tăng khối lượng 341,2 g/con/ngày và chất khô ăn vào/100 kg thể trọng 2,98 kg. Nghiên cứu của Huyen và cs. (2012) và Tan và cs. (2012) cho thấy bổ sung lá dâu dạng pellet bò có thể tăng khối lượng 600 g/ngày với khẩu phần cơ sở là thức ăn thô dinh dưỡng như rơm. Simon Quigley và cs. (2009) cho thấy chỉ nuôi bò với keo đậu ADG: 0,336 kg/con/ngày trong khi đó nuôi bò bằng keo đậu + ngô: ADG đạt 0,614 kg/con/ngày.

Theo Reed, (1995); Mueller-Harvey, (2006) tanin làm giảm phân giải protein trong dạ cỏ vì nó làm cho protein ít bị phân giải ở dạ cỏ hơn bởi vi sinh vật. Khi N ít bị phân giải dạ cỏ khi bổ sung các loại lá giàu N thì lượng N từ khẩu phần xuống dạ múi khế tăng lên và do đó lượng axit amin thiết yếu hấp thu tại ruột non có thể cũng tăng lên (Ben Salem và cs., 2005; Ramírez-Restrepo và Barry, 2005; Hess và cs., 2008). Vì lý do này năng suất bò có thể đã được cải thiện (Michael và cs., 2013). Tuy nhiên, ngoài các ảnh hưởng tích cực về dinh dưỡng, keo đậu có chứa mimosine một a xit amin tự do có độc với hàm lượng khá cao trong lá (9% chất khô) (Hegarty và cs., 1964; Jones và cs., 1976; Allison và cs., 1992; Jones, 1994) thấy mimosine nhanh chóng chuyển thành 3,4-dihydroxypyridine (3,4-DHP) sau tiêu hóa dẫn đến kết quả là lượng thức ăn ăn vào giảm, giảm tăng khối lượng, rụng lông mặc dù khẩu phần ăn có giá trị dinh dưỡng cao (Jones và Hegarty, 1984; Pattanaik và cs., 2007). Jones và Hegarty (1984) báo cáo rằng các hiệu quả trên xảy ra khi keo

dậu chiếm trên 30% khẩu phần. Myambi và cs. (2012) cho rằng đưa keo đậu vào khẩu phần cho bò sữa dưới 30% là mức tối đa.

3.4.3. Hiệu quả sử dụng thức ăn của bò thí nghiệm

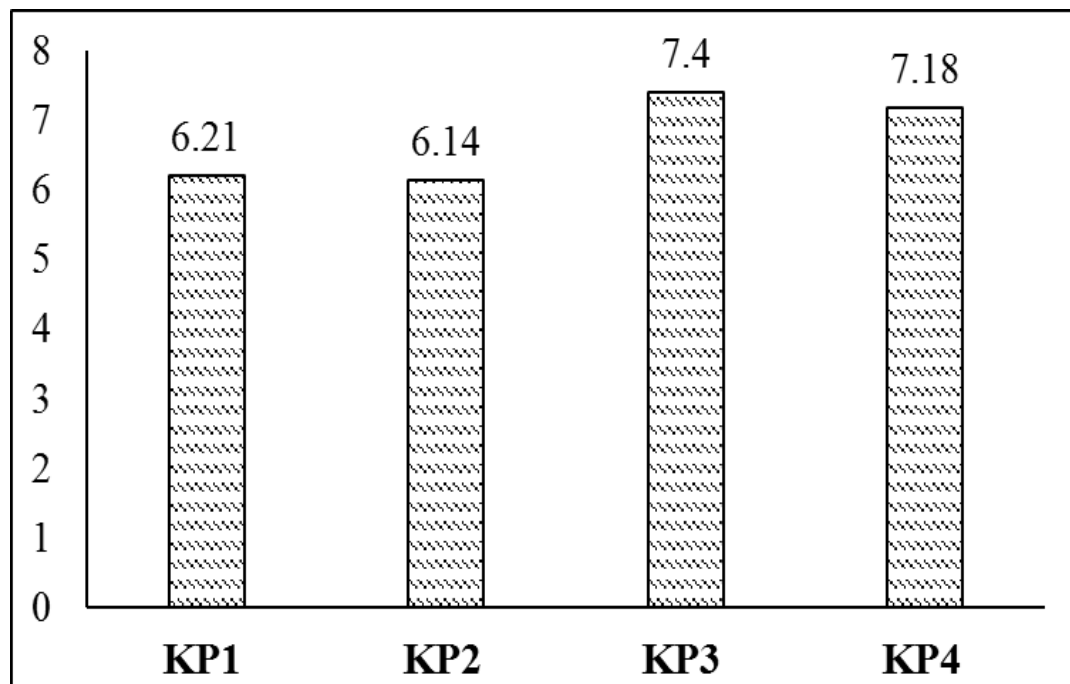
Kết quả về hiệu quả sử dụng thức ăn được tính toán dựa trên hai chỉ tiêu về lượng thức ăn ăn vào và tăng khối lượng trung bình trong thời gian thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 3.20 và minh họa qua Hình 3.13.

Bảng 3.20. Hiệu quả sử dụng thức ăn

Chỉ tiêu	KP1	KP2	KP3	KP4	SEM
• VCK ăn vào (kg/con/ngày)	4,12	4,21	4,13	4,11	0,04
• Tăng KL.trung bình cả giai đoạn (g/con/ngày)	662,52 ^a	683,34 ^a	574,44 ^b	573,94 ^b	12,11
• Hiệu quả sử dụng thức ăn (kg VCK/kg tăng khối lượng)	6,21 ^a	6,14 ^a	7,40 ^b	7,18 ^b	0,27

Ghi chú: Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). VCK: vật chất khô; Tăng KL.: tăng khối lượng

Hiệu quả sử dụng thức ăn từ 6,14 - 7,40 kg VCK/kg tăng khối lượng, thấp nhất nhóm bò ăn KP2 cao nhất ở nhóm bò ăn KP3 và có sai khác về mặt thống kê ($P < 0,05$). Tiêu tốn chất khô/kg tăng khối lượng của bò thu được của chúng tôi nằm trong khoảng tiêu chuẩn của ARC (1980); NRC (1984); INRA (1989); Rajan (1990); Perry (1990) và AFRC (1993) dao động trong khoảng 7,1 - 8,8 kg chất khô/kg tăng khối lượng. Theo Kearl (1982) bò 200-300 kg, tăng khối lượng 0,75 kg/con/ngày cần 5,4-7,4 kg chất khô/con/ngày. Như vậy lượng chất khô ăn vào bò thí nghiệm nằm trong khoảng tiêu chuẩn khẩu phần.



Hình 3.13. Hiệu quả sử dụng thức ăn (kg VCK/tăng khối lượng) của bò thí nghiệm

3.4.4. Phát thải khí mêtan của bò thí nghiệm

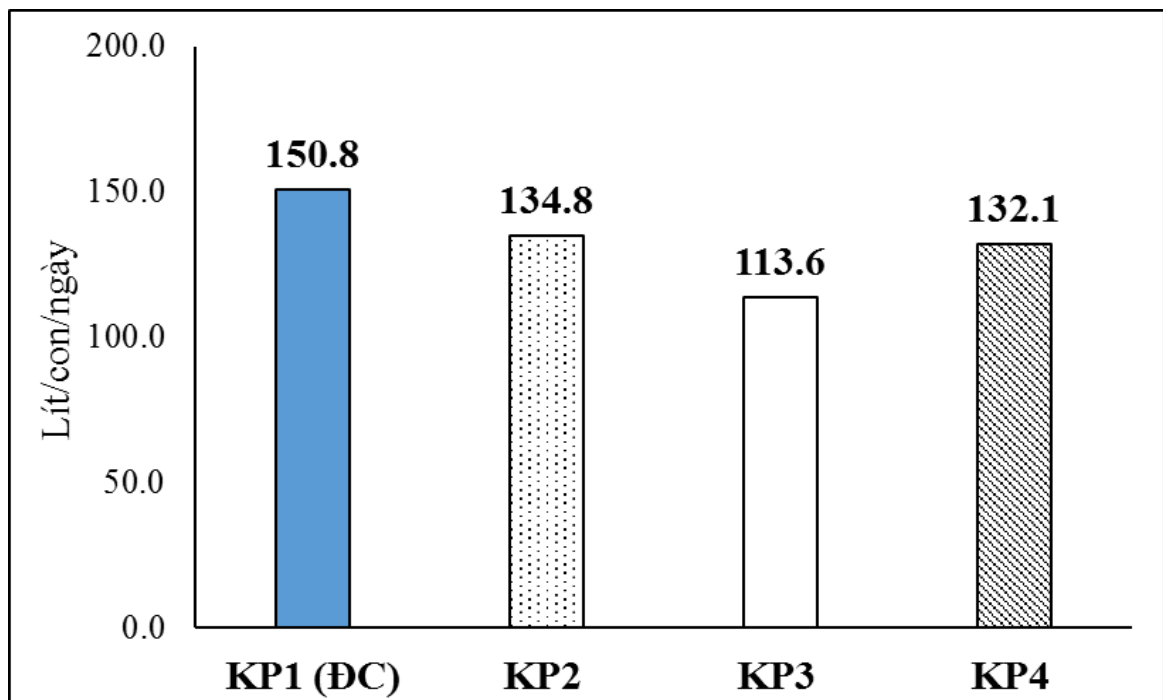
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của khẩu phần bổ sung các mức tanin từ cây keo dậu đến lượng CH_4 thải ra

Chỉ tiêu	KP1 (ĐC)	KP2	KP3	KP4	SEM
V_{CH_4} (l/con/ngày)	150,8 ^a	134,8 ^a	113,6 ^b	132,1 ^{ab}	2,89
L_{CH_4} /100 kg BW	93,24 ^a	79,16 ^{ab}	77,20 ^b	70,84 ^b	4,94
V_{CH_4} (l/kg BW ^{0.75})	3,42 ^a	2,98 ^{ab}	2,68 ^b	2,92 ^{ab}	0,08
L_{CH_4} /kg tăng khối lượng	299,58 ^a	230,10 ^b	197,68 ^b	203,56 ^b	9,12
g_{CH_4} /100 kg BW	66,86 ^a	56,76 ^{ab}	55,36 ^b	50,80 ^b	3,54
g_{CH_4} /kg BW ^{0.75}	2,38 ^a	2,05 ^{ab}	2,00 ^b	1,80 ^b	0,12
g_{CH_4} /kg tăng khối lượng	214,80 ^a	165,0 ^b	141,72 ^b	145,94 ^b	6,53

Ghi chú: Giá trị trung bình trong cùng một hàng với các chữ cái khác nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); BW: khối lượng; BW^{0.75}: khối lượng trao đổi.

Việc xác định tổng khí mêtan sản sinh (L/con/ngày) được xác định thông qua hệ thống phân tích khí mêtan gắn với buồng hô hấp. Lượng khí

mêtan sản sinh trên mỗi kg tăng khối lượng cũng được tính toán khi bò được ăn khẩu phần khác nhau. Kết quả về ảnh hưởng của khẩu phần ăn đến lượng CH_4 thải ra được trình bày ở Bảng 3.21 và được minh họa qua Hình 3.14 và 3.15.

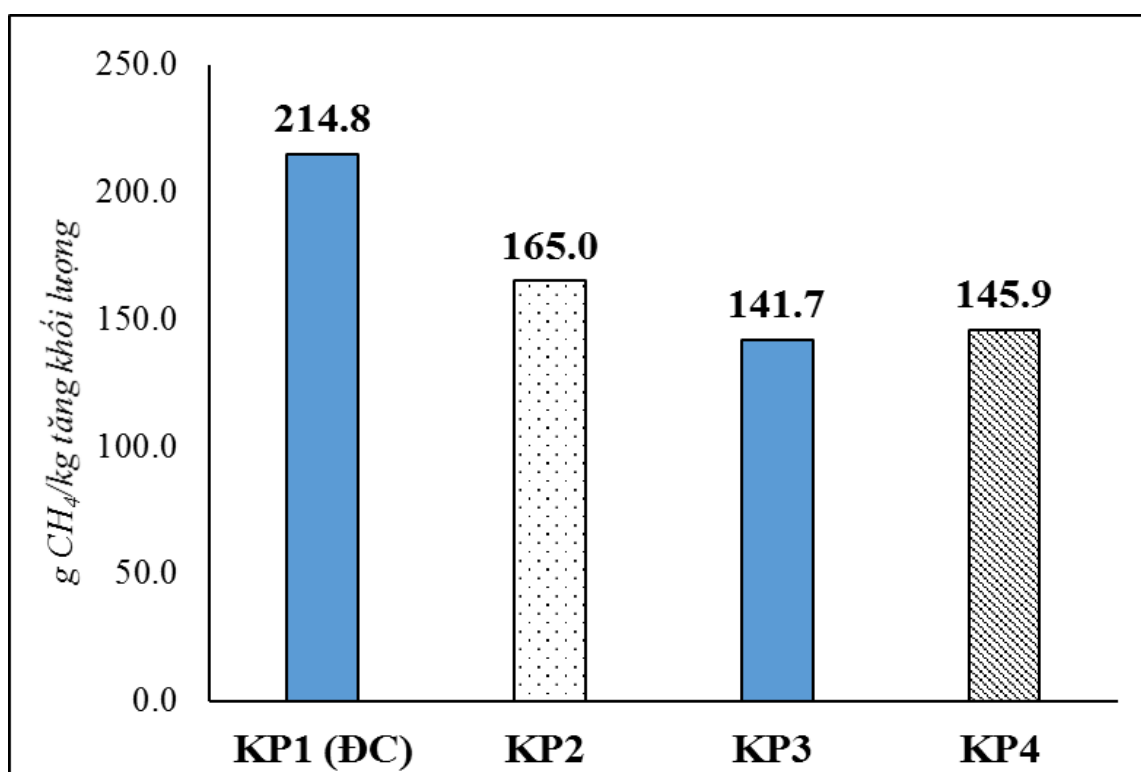


Hình 3.14. Lượng CH_4 sản sinh của bò thí nghiệm

Số liệu thu được ở Bảng 3.21 cho thấy lượng CH_4 sản sinh (l/con/ngày) dao động từ 113,6 – 150,8 lít tùy thuộc vào khẩu phần và có sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa nhóm bò ăn KP4 so với nhóm ăn KP1 và KP2 (Hình 3.14). Nghiên cứu của Hariadi và Santoso, (2010) trong điều kiện *in vitro* cho thấy, khi bổ sung 20% *Biophytum petersianum* (có 4,3% tanin) và *Sesbania grandiflora* (có 1,9% tanin) vào chất nền đã làm giảm lần lượt từ 17 – 25% và 9,2 -10,3% lượng mêtan thải ra. Trong điều kiện *in vivo*, Grainger và cs. (2009) đã bổ sung hai mức tanin (8,6 và 14,6 g/kg DMI) được tách chiết từ *Acacia mearnsii* vào khẩu phần của bò sữa chăn thả ăn 4,5 kg thức ăn tinh. Kết quả cho thấy việc bổ sung này đã làm giảm thiểu 11,5 và 28% mêtan thải ra.

Tương tự như thí nghiệm *in vivo*, lượng CH_4 có xu hướng giảm đáng kể khi bổ sung tanin từ keo đậu, xu hướng này cũng thấy khi lượng khí mêtan sản sinh tính trên 100 kg khối lượng cơ thể và trên 1 kg khối lượng trao đổi.

Lượng CH_4 sản sinh (g) tính trên 1 kg tăng khối lượng từ 141,7 – 214,8 g, cao nhất ở nhóm bò đối chứng (KP1) trong khi đó giá trị này ở nhóm bò ăn khẩu phần KP2; KP3 và KP4 được bổ sung tanin từ lá keo đậu lần lượt là 141,7; 145,9 và 165g và có sự sai khác đáng kể ($P < 0,05$) (Hình 3.15)



Hình 3.15. Lượng CH_4 sản sinh/1kg tăng khối lượng của bò thí nghiệm

3.4.5. Sơ bộ tính toán hiệu quả kinh tế

Hiệu quả được tính toán trên cơ sở: giá mua thức ăn, giá mua bò, bán bò tại thời điểm bắt đầu và kết thúc thí nghiệm đồng thời không tính đến chi phí công lao động. Các chi phí này được coi như ngang nhau cho cả bốn khẩu phần. Kết quả tính sơ bộ hiệu quả kinh tế được trình bày ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Sơ bộ ước tính hiệu quả kinh tế

	Chỉ tiêu	Khối lượng (kg)	Giá (1.000 đ)	Thành tiền (1.000 đ)
KP1	Mua bò	157,1	80	12.568
	Mua thức ăn	668,8	3,22	2.154,3
	Bán bò	216,7	80	17.336
	Tổng thu			2.613,7
	Thu bình quân/tháng			871,2
KP2	Mua bò	157,7	80	12.616
	Mua thức ăn	633,1	3,72	2.352,5
	Bán bò	219,2	80	17.536
	Tổng thu			2.567,5
	Thu bình quân/tháng			855,8
KP3	Mua bò	157,2	80	12.576
	Mua thức ăn	611,9	3,75	2.297,2
	Bán bò	208,9	80	16.712
	Tổng thu			1.838,8
	Thu bình quân/tháng			612,9
KP4	Mua bò	158,9	80	12.712
	Mua thức ăn	607,1	4,13	2.507,2
	Bán bò	210,5	80	16.840
	Tổng thu			1.620,8
	Thu bình quân/tháng			540,3

Kết quả này cho thấy tùy theo khẩu phần nuôi dưỡng, thu nhập bình quân đạt được 540.300 – 871.200 đồng/con/tháng, cao nhất ở nhóm bò ăn khẩu phần KP1 tiếp đến là ở nhóm bò ăn khẩu phần KP2. Tuy nhiên, sự chênh lệch không nhiều và xem xét kết hợp với các yếu tố khác là tăng khối lượng và phát thải mêtan ra môi trường cho thấy thì nhóm bò ăn khẩu phần

KP2 được bổ sung 20% lá keo dậu/chất khô khẩu phần đạt hiệu quả nhất. Thu nhập tính trên đầu gia súc trong thí nghiệm này cao hơn so với các số liệu từ một số nghiên cứu khác có thể là do biến động giá cả của đầu vào và đầu ra tại các thời điểm bắt đầu và kết thúc thí nghiệm. Tại Trung Quốc khi vỗ béo bò trên qui mô lớn bằng hạt bông và rơm lúa mì xử lý urê, hạch toán sau 3 tháng lãi từ 200.000 - 600.000 đ/con (Dolberg và Finlayson, 1995). Tại Đắk Lắk, Trương Tấn Khanh (2012) khi sử dụng bột lá họ đậu hoặc thức ăn hỗn hợp có bột cá và cỏ để vỗ béo bò lai Sind có khối lượng bắt đầu thí nghiệm lớn hơn bò nuôi trong thí nghiệm này cho thấy: Lợi nhuận tính trên một bò/tháng là 370.912 đến 435.542 đồng/con/tháng, tùy thuộc vào giá của nguồn thức ăn đầu vào.

CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

- Nguồn tanin có ảnh hưởng rất khác nhau đến lượng mêtan sinh ra khi lên men *in vitro*. Về tổng thể khi xem xét cả lượng mêtan sinh ra và lên men trong điều kiện *in vitro* thì tanin từ lá keo dậu và lá sắn tốt hơn tanin tinh khiết, tanin từ lá chè kém nhất về hiệu quả.

- Mức tanin bổ sung có ảnh hưởng rất khác nhau đến lượng mêtan sinh ra khi lên men *in vitro*. Về tổng thể khi xem xét cả lượng mêtan sinh ra và lên men trong điều kiện *in vitro* thì mức tanin 5% tốt nhất về hiệu quả tổng hợp

- Lá cây keo dậu có tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ (60,9%) và giá trị năng lượng trao đổi (9,2 MJ) cao nhất so với các loại lá cây khác trong nghiên cứu đồng thời có tác dụng giảm thiểu mêtan phát thải thấp.

- Mức bổ sung thích hợp lá cây keo dậu khô vào khẩu phần nuôi bò lai Sind sinh trưởng là 20% chất khô khẩu phần (tương đương 0,3% tanin), làm giảm rõ rệt lượng CH₄ sản sinh (g)/kg tăng khối lượng ($P < 0,05$) so với nhóm bò ăn khẩu phần đối chứng (165,0 so với 214,8) đồng thời đạt tăng khối lượng cao nhất 683g/con/ngày, hiệu quả sử dụng thức ăn tốt nhất (6,14 kg CK/kg tăng khối lượng).

4.2. ĐỀ NGHỊ

- Cho áp dụng mức bổ sung 0,3% tanin từ cây keo dậu vào khẩu phần nuôi bò lai Sind sinh trưởng.

- Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của bổ sung ngọn lá cây thức ăn chứa tanin trong khẩu phần vỗ béo đến khả năng sản xuất, hiệu quả sử dụng thức ăn và phát thải khí mêtan ở bò lai hướng thịt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

- Chu Mạnh Thắng. 2017. Phát thải khí methane từ dạ cỏ của bò - ảnh hưởng của chất lượng khẩu phần ăn nuôi bò. Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi – Số 82 (tháng 12/2017): 2-8.
- Chu Mạnh Thắng, Nguyễn Đình Tường và Trần Hiệp. 2016. Ảnh hưởng của việc bổ sung tanin từ bột chè xanh (*Camellia sinensis*) đến sinh trưởng, hiệu quả sử dụng thức ăn và mức độ phát thải khí mêtan từ dạ cỏ của bò thịt. Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi số 63 - tháng 05/2016. (56-67)
- Đình Văn Mười. 2012. Nghiên cứu xác định tỷ lệ tiêu hóa, giá trị dinh dưỡng và xây dựng phương trình chẩn đoán các giá trị này của một số loại thức ăn dùng cho gia súc nhai lại. Luận án Tiến sỹ nông nghiệp. Viện chăn nuôi. Bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn, 2012.
- Dương Thanh Liêm. 2008. Độc chất học thực phẩm và vệ sinh an toàn nông sản thực phẩm. Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM.
- Hồ Thị Liễu. 2004. Điều tra những loài thực vật thuộc lớp 2 lá mầm chứa tannin vùng tây nam khu BTTN Sơn Trà - Đà Nẵng. Kỷ yếu hội nghị khoa học Đại học Đà Nẵng lần thứ 3: 356-360
- Lê Tự Hải. 2010 . Nghiên cứu chiết tách, xác định thành phần hóa học của hợp chất tannin từ lá chè xanh và khảo sát tính ức chế ăn mòn kim loại của nó. Tạp chí Khoa học Công nghệ, Đại học Đà Nẵng, Số 1 (36):71-76
- Nguyễn Xuân Trạch. 2003. Sử dụng phụ phẩm nuôi gia súc nhai lại. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- TCVN 4326-2007, TCVN 4328-2007, TCVN 4321-2007, TCVN 4329-2007, TCVN 4327-2007
- Trần Hiệp, Phạm Kim Đăng, Nguyễn Ngọc Bằng, Chu Mạnh Thắng. 2016. Ảnh hưởng của việc bổ sung tanin trong chè xanh đến khả năng sản xuất và phát thải khí mêtan từ dạ cỏ của bò sữa. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 14 (4): 579-589.
- Trương Tấn Khanh. 2012. Ảnh hưởng của bổ sung các nguồn protein khác nhau trong thức ăn hỗn hợp của khẩu phần đến tăng khối lượng và hiệu quả kinh tế nuôi bò vỗ béo tại Ea Kar, Đắk Lắk. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, 4. 2012. Pp: 515-522.
- Vũ Chí Cương, Phạm Kim Cương, Phạm Bảo Duy. 2008. Tốc độ và động thái sinh khí *in vitro*, tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ, năng lượng trao đổi ước tính của một

số loại thức ăn tinh và giàu đạm cho gia súc nhai lại. Tạp chí khoa học năm 2008.

Vũ Duy Giảng. 2001. Các chất kháng dinh dưỡng (antinutritional factors) trong thức ăn của động vật nhai lại. Hội thảo về Dinh dưỡng Gia súc Nhai lại - Do Chương trình Link - Viện Chăn nuôi - Hội Chăn nuôi Việt Nam, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

Abdulrazak, S. A., Fujihara, T., Ondiek, J. K and Ørskov, E. R. 2000. Nutritive evaluation of some Acacia tree leaves from Kenya. *Animal Feed Science and Technology*, 85 (2000) 89—98,

Abecia, L., Toral, P.G., Martín-García, A.I., Martínez, ., Tomkins, N.W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C.J. & Yañez-Ruiz, D.R. 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *J. Dairy Sci.* 95: 2027–2036.

Abegaz, A., van Keulen, H. & Oosting, S.J. 2007. Feed resources, livestock production and soil carbon dynamics in Teghane, Northern Highlands of Ethiopia. *Agric. Syst.* 94: 391–404.

Aerts RJ, Barry TN and McNabb WC. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agri. Ecosyst. Environ.*, 75: 1–12.

AFRC.1993. Energy and Protein Requirements for Ruminants. University Press, Cambridge. UK.

Aganga, A. A., Tsopito, C. M. and Adogla-Bessa, T. 1998. Feed potential of accacia species to ruminants in Botswana. *Arch, Zootec*, 47: 659-668, 1998.

Agastin, A.M. Naves, A. Farant, X. Godard, B. Bocage, G. Alexandre and M. Boval. 2012. Effects of feeding system and slaughter age on the growth and carcass characteristics of tropical-breed steers. *J ANIM SCI* August 2013 vol. 91 no. 8 3997-4006

Aharoni Y, Gilboa N, Silanikove N. 1998. Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim Feed Sci Tech* 71: 251-267.

Aiple, K.P., Steingass, H. and Drochner, W. 1996. Prediction of net energy content of raw materials and compound feeds for ruminants by different laboratory methods. *Arch Anim Nutr.* 49, 213-220.

- Alaboudi, R. & Jones, G.A. 1985. Effects of acclimation to high nitrate intake on some rumen fermentation parameters in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 65: 841–849.
- Albrecht, K.A. & Muck, R.E. 1991. Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. *Crop Sci.* 31: 464–469.
- Allison M.J. & Reddy, C.A. 1984. Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate. In Klug M.J & Reddy, C.A., eds. *Current Perspectives in Microbial Ecology, Proceedings of the 3rd International Symposium on Microbial Ecology*, pp. 248–256. Washington D.C., American Society for Microbiology.
- Allison MJ, Mayberry, WR, McSweeney CS, Stahl DA. 1992. *Synergistes jonesii*, gen. nov, sp. nov: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Systematic and Applied Microbiology* 15:522-529.
- Al-Masri, M. R. 2003. An in vitro evaluation of some in conventional ruminal feeds in terms of the organic matter digestibility, energy and microbial biomass. *Trop. Anim. Health and Prod.*, 35 (2): 155-167.
- Alves, A.R., Guimaraes-Beelen P.M., Gonzaga Neto S., Lima J.S.B. and Pereira W.E. 2006. Consumo e digestibilidade do feno de sabia por caprinos e ovinos recebendo suplementacao com polietilenoglicol. *Proceedings of the 43rd Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, July 24-27, 2006, Joao Pessoa, Brazil
- Animut, G., Goetsch, A. L., Puchala, R., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H. and Wells, J. 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 144, pp. 212-27.
- AOAC. 1975. *The Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*.
- ARC. 1980. *The Nutrient Requirements for Ruminant Livestock. Suppl. 1. Commonwealth Agricultural Bureau, Slough.*
- Archimède, H., Eugène, M., Magdeleine, C.M., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P. and Doreau, M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 59–64.
- Athanasiadou SI, Kyriazakis, Jackson F and Coop RL. 2000. Effects of short-term exposure to condensed tannins on an adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Rec.*, 146: 728–732.

- Atwell, O.G., Jaster, E.H., Moore, K.J. & Fernando, R.L. 1988. Evaluation of high oil corn and corn silage for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 71: 2689–2698.
- Austin PJ, Suchar LA, Robbins CT, Hagerman AE. 1989. Tannins-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *J Chem Ecol* 15: 1335-1347.
- Ayres MP, Clausen TP, MacLean S, Redman AM and Reichardt PB. 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 78: 1696–1712.
- Babayemi, O.J., Bamikole M.A. and Modupe O. Daodu. 2009. In vitro gas production and its prediction on metabolizable energy. Organic matter digestibility and short chain fatty acids of some tropical seeds. *Pak. J. Nutr.*, 8 (7):1078-1082.
- Barry TN and Duncan SJ. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1. Voluntary intake. *Brit J Nutr* 51: 485-491.
- Barry TN and Manley TR. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep 2. Quantitative digestion of carbohydrates and protein. *Br J Nutr* 51: 493.
- Barry TN and McNabb WC. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81.
- Basset-Mens C, Van der Werf H. 2005. Scenario-based environmental assessment of farming systems: the case of pig production. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 105, 127-144.
- Bayble,T., Solomon Melaku, Prasad N K. 2007. Effects of cutting dates on nutritive value of Napier (*Pennisetum purpureum*) grass planted sole and in association with Desmodium (*Desmodium intortum*) or Lablab (Lablab purpureus). *Livestock Research For Rural Development* 19 (1) 2007.
- Beauchemin K.A. and McGinn, S.M. 2006. Enteric methane emissions from growing beef cattle as affected by diet and level of intake. *Can. J. Anim. Sci.* 86:401–408.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F., McAllister, T, A. 2008, Nutritional management for enteric methane abatement: a review, *Aust, J, Ep, Agric*, 48, 21–27, doi:10.1071/EA07199,
- Beauchemin, K. A. and McGinn, S. M. 2006. Effects of various feed additives on the methane emissions from beef cattle. *International Congress Series*, vol.

1293, pp. 152-5.

- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M. and Petit, H.V. 2007b. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Can. J. Anim. Sci.* 87:431–440.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Benchaar, C. and Holtshausen L. 2009b. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 92:2118–2127.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Martinez, T.F. and McAllister, T.A. 2007a. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85:1990–1996.
- Beddows AR. 1956. Observations on hoove, haven, blown or bloat taken from agricultural writings. *Journal of the Agricultural Society* 33: 12-15.
- Ben Salem, H., Makkar, H.P.S., Nefzaoui, A., Hassayoun, L. and Abidi, S. 2005. Benefit from the association of small amounts of tannin-rich shrub foliage (*Acacia cyanophylla* Lindl.) with soya bean meal given as supplements to Barbarine sheep fed on oaten hay. *Animal Feed Science and Technology* 122(1-2), 173-186.
- Benchaar, C. and Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 338–355.
- Benchaar, C., Hristov, A.N. and Greathead, H. 2009. Essential oils as feed additives in animal nutrition. In T. Steiner, ed. pp. 111–146, *Phytogenics in Animal Nutrition*. Nottingham, UK Nottingham University Press
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J. and Chouinard, P.Y. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.* 90: 886–897.
- Bernays EA, Cooper Driver G and Bilgener M. 1989. Herbivores and plant tannins. In: Begon, M., Fitter, A.H., Ford, E.D., MacFadyen, A. (Eds.), *Advances in Ecological Research*, vol. 19. Academic Press, London, pp. 263–302.
- Beuvink, J. M. W. and Spoelstra, S. F. 1992. Interactions between substrate, fermentation end products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms in vitro. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 505-9.

- Bhatta, R., Enishi, O., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Takusari, N., Higuchi, K., Tajima, K., Takenaka, A. and Kurihara, M. 2012. Methane reduction and energy partitioning in goats fed two concentrations of tannin from *Mimosa spp.* J. Agric. Sci. (Cambr.), doi:10.1017/ S0021859612000299.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M. 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. Journal of Dairy Science, vol. 92, no. 11, pp. 5512-22.
- Bhatta, R., Baruah, L., Saravanan, M., Suresh, K. P. and Sampath, K. T. 2012. Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis *in vitro*. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01285.x.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M. 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. Journal of Dairy Science, vol. 92, no. 11, pp. 5512-22.
- Blümmel, M., Vishala, A., Ravi, D., Prasad, K.V.S.V., Ramakrishna Reddy, C. and Seetharama, N. 2010. Multi-environmental investigations of food-feed trait relationships in Kharif and Rabi sorghum (*Sorghum bicolor (L) Moench*) over several years of cultivars testing in India. Anim. Nutr. Feed Technol. 10 (Suppl.1): 11–21.
- Blümmel, M. and Orskov, E. R. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed Sci. Technol., vol. 40, pp. 109–19.
- Blümmel, M., Aiple, K. P., Steingass, H. and Becker, K. 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas evolution in vitro in feedstuffs of widely differing quality. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., vol. 81, pp. 157-67.
- Blümmel, M., Anandan, S. and Prasad, C.S. 2009. Potential and Limitations of by-Product Based Feeding Systems to Mitigate Greenhouse Gases for Improved Livestock Productivity. In Proceedings of the 13th Biennial Conference of Animal Nutrition Society of India, pp. 68–74. Bangalore, India. National Institute of Animal Nutrition and Physiology.
- Blümmel, M., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 1997. In vitro gas production: a

- technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 77, no. 1-5, pp. 24-34.
- Bodas, R. N., Prieto, N. R., Garcí'a-Gonzalez, R. S., Andres, S., Giraldez, F. J. and Lopez, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*: 176, 78–93.
- Broderick, G.A. and Albrecht, K.A. 1997. Ruminal *in vitro* degradation of protein in tannin-free and tannin-containing forage legume species. *Crop Sci.* 37: 1884–1891.
- Broderick, G.A. 1995. Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73: 2760–2773.
- Broderick, G.A., Muck, R.E. and Grabber, J.H. 2012. Effects of replacing dietary lucerne silage with birdsfoot trefoil silage containing different levels of condensed tannin on production of lactating dairy cattle. In K. Kuoppala, M. Rinne and A. Vanhatalo, eds. *Proceeding of the XVI International Silage Conference*, pp. 150–151. MTT Agrifood Research Finland, University of Helsinki.
- Brown, E.G., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Gutierrez-Bañuelos, H., McReynolds, J.L., Slay, L.J., Callaway, T.R. and Nisbet, D.J. 2011. Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 66–167: 275–281.
- Burns, J.C. and Pond, K.K. 1994. Measurement of forage intake. In Fahey, Jr.G.C. (ed). *Forage Quantity Evaluation and Utilization*, Madisin, Wicosin, USA. pp 494-532
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. 2008. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90: 2580–2595.
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmuller, A., Hess, H. D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 961–970.
- Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmuller, A. and Hess, H.D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 56(9), 961-970.
- Caygill JC and Mueller-Harvey I .1999. Secondary Plant Products - Antinutritional and beneficial actions in animal feeding.

- Chen, X.B. 1995. Fit Curve Macros for Microsoft Excel (NEWAY EXCEL). Unpublished note pad
- Chenost, M., Aufrere, J. and Macheboeuf, D. 2001. The gas test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Anim. Res. Dev.*, vol. 50, pp. 349-64.
- Chenost, M., Deverre, F., Aufrere, J. and Demarquilly, C. 1997. The use of gas-test technique for predicting the feeding value forage plants. In: *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Proceedings of Occasional Meeting of the British Society of Animal Science, 8-10 July 1997, University of Reading, UK. Pp:22-38
- Chilliard, Y. and Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 467–492.
- Chiquette J., Cheng KJ., Costerton JW. and Milligan LP. 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using *in vitro* and *in sacco* techniques. *Can J Anim Sci* 68, 751-760.
- Chu, D.C. and Juneja, L.R. 1997. General chemical composition of green tea and its infusion. Chemistry and applications of green tea, Yamamoto, T., Juneja LR., Chu CD., and Kim M., Eds.; Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 13-22.
- Chumpawadee, S. and Pimpa O. 2008. Effect of non forage high fibrous feedstuffs as fiber sources in total mixed ration on gas production characteristics and *in vitro* fermentation. *Pak. J. Nutr.*, 7(3): 459-464.
- Chumpawadee, S., Chantiratikul, A., and Chantiratikul, P. 2007. Chemical composition and nutritional evaluation of protein feeds for ruminants using an *in vitro* gas production technique. *Journal of Agricultural Technology*, 191-202.
- Clinquart, A., Micol, D., Brundseaux, C., Dufrasne, I. and Istasse, L. 1995. Utilisation des matieres grasses chez les bovins à l'engraissement. *INRA Prod. Anim.* 8: 29–42.
- Cochran, R.C. and Galyean, M.L. 1994. Measurement of *in vivo* forage digestion by ruminants. Forage Quality, Evaluation and Utilization. Madison, Wincosin, USA. pp 613-643

- Cockwill, C.L., McAllister, T.A., Olson, M.E., Milligan, D.M., Ralston, B.J., Huisma, C. and Hand, R.K. 2000. Individual intake of mineral and molasses supplements by cows, heifers and calves. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 681–690.
- Coley PD. 1986. Costs and benefits of defense by tannins in a neotropical tree. *Oecologia* 70: 238–241.
- Colombini, S., Colombari, G., Crovetto, G.M., Galassi, G. and Rapetti, L. 2009. Tannin treated lucerne silage in dairy cow feeding. *Ital. J. Anim. Sci.* 8(Suppl. 2): 289–291.
- Cone. J. W. and Van Gelder. A. H. 1998. In vitro microbial protein synthesis in rumen fluid estimated with the gas production technique: Gas Production: Fermentation Kinetics for Feed Evaluation to Assess Microbial Activity. British Society of Animal Science, Penicuik, UK (2000), pp. 25 – 26.
- Cone. J. W., Vangelder A. H., Visscher G. J. W. and L. Oudshoorn. 1996. Use of a new automated time related gas production apparatus to study the influence of substrate concentration and source of rumen fluid on fermentation kinetics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61:113-128.
- Daniel, K. 1996. Effect of nitrogen application and stages of development on yield and nutritional value of Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Ethiopian Journal of Agricultural Science* 15: 86-101.
- Datt, C. and Singh G. 1995. Effect of protein supplementation on in vitro digestibility and gas production of wheat straw. *Indian J. Dairy Sci.*, 48: 357-361.
- Demeyer, D., De Meulemeester M., De Graeve K. and Gupta B. W. 1988. Effect of fungal treatment on nutritive value of straw. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 53, 1811–1819.
- Denia C. Delgado, Juana Galindo, J. Cairo, Ibett Orta, Marbelis Domínguez and Natacha Dorta. 2013. Supplementation with foliage of *L. leucocephala*. Its effect on the apparent digestibility of nutrients and methane production in sheep. *Cuban Journal of Agricultural Science*, Volume 47, Number 3, 2013. Pp 267-271.
- Devendra, C. and Leng, R.A. 2011. Feed resources for animals in Asia: Issues, strategies for use, intensification and integration for increased productivity. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 24:303–321.
- Dolberg, F. and Finlayson, P. 1995. Treated straw for beef production in China. *Wld. Anim. Rev.* No 82, pp14-24.
- Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M. and Morgavi, D.P. 2011a. Leviers

- d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. In M. Doreau, R. Baumont and J.M. Perez, eds. *Gaz à effet de serre en élevage bovin : le méthane*. Dossier, INRA Prod. Anim. 24: 461–474. Rijksuniv. Gent 53, 1811–1819.
- Eugène, M., Martin, C., Mialon, M.M., Krauss, D., Renand, G. and Doreau, M. 2011. Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 330–337.
- Eugène, M., Masse, D., Chiquette, J. and Benchaar, C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 88: 331–334.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2011a. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries. In H.P.S. Makkar, ed. *Proceedings of the FAO Electronic Conference, FAO Animal Production and Health Proceedings*. No. 11. Rome, Italy.
- FAO. 2006. *Livestock's long shadow - environmental issues and options*. edited by H. Steinfeld, P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales and C. de Haan. Rome.
- FAO. 2013. *Mitigation of green house emissions in livestock production. A review of technical options for non-CO₂ emissions*. Editor: Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson and Harinder P.S. Makkar. *FAO Animal Production and Health Paper*, 177, 2013.
- Faulkner, D.B. and Hutjens, M.F. 1989. Nitrates in livestock feed. BCH-5610 Extension Beef Cattle Resource Committee, University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension ([http://www.iowabeefcenter.org/Beef percent20Cattle percent20Handbook/Nitrates_Feed. pdf](http://www.iowabeefcenter.org/Beef%20percent20Cattle%20Handbook/Nitrates_Feed.pdf); accessed on 27 May 2012).
- Fievez, V., Babayemi, O. J. and Demeyer, D. 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 123–124, Part 1, no. 0, pp. 197-210.
- Foley, P.A., Kenny, D.A., Callan, J.J., Boland, T.M. and O'Mara, F.P. 2009. Effect of dl-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87: 1048–1057.
- Frutos P Hervás G, Giráldez FJ, Fernández M and Mantecón AR. 2000. Digestive utilization of quebracho- treated soya bean meal in sheep. *J Agr Sci* 134: 101-108.

- Frutos P, Raso M, Hervás G, Mantecón AR, Pérez V, Giráldez FJ. 2004. Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolyzable tannins extract is included in the diet of finishing lambs. *Anim Res* 56: 127-136.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. and Mantecón, A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish J. Agric. Res.* 2: 191–202.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar H. P. S. and Becker, K. 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 72: 261–281.
- Getachew, G., Crovetto G.M., Fondivila M., Krishnamoorthy U., Singh B., Spaghero M., Steingass H., Robinson P.H. and Kailas M.M. 2002. Laboratory variation of 24h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 102: 169-180.
- Getachew, G., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *The Journal of Agricultural Science* 139, 341-352.
- Goel, G. and Makkar, H. P. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop Anim Health Prod.*, vol. 44, no. 4, pp. 729-739.
- Goering, H. K. and Van Soest P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA, Agricultural Handbook No. 379.
- Grainger, C. and Beauchemin, K.A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 308–320.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C. and Eckard, R. J. 2009a. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cow. *Can. J. Anim. Sci.*, vol. 89, pp. 241–51.
- Grainger, C., Clarke, T., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M. and Eckard, R.J. 2008. Supplementation with whole cottonseed reduces methane emissions and can profitably increase milk production of dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 73–76.
- Grainger, C., Williams, R., Clarke, T., Wright, A.D. and Eckard, R.J. 2010b. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of

- methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *J. Dairy Sci.* 93: 2612–2619.
- Grando, S., Baum, M., Ceccarelli, S., Goodchild, A.V., El-Haramain, F.J., Jahoor, A. and Backes, G. 2005. QTLs for straw quality characteristics identified in recombinant inbred lines of a *Hordeum vulgare* x *H. spontaneum* cross in a Mediterranean environment. *Theor. Appl. Genet.* 110: 688–695.
- Gutierrez-Banuelos, H., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Slay, L.J., Ramlachan, N., or- rocks, S.M., Callaway, T.R., Edrington, T.S. and Nisbet, D.J. 2007. Zoonotic bacterial populations, gut fermentation characteristics and methane production in feedlot steers during oral nitroethane treatment and after the feeding of an experimental chlorate product. *Anaerobe*:13:21–31.
- Hagerman AE, Robbins CT, Weerasuriya Y, Wilson T and Mcarthur C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *J Range Manage* 45: 57-62.
- Hamid, P., Akbar, T., Hossein, J. and Ali, M. G. 2007. Nutrient Digestibility and Gas Production of Some Tropical Feeds Used in Ruminant Diets Estimated by the in vivo and in vitro Gas Production Techniques. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 108-13.
- Hardin, G. 1968. The Tragedy of the Commons. *Science* 162: 1243–1248.
- Hariadi, BT and Santoso, B. .2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, pp. 456-61.
- Haslam E.1982. Proanthocyanidins. (J.B. Harborne and T.J. Mabrey, editors) *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London
- Hegarty MP; Court RD; Thorne PM. 1964. The determination of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine in biological material. *Australian Journal of Agricultural Research* 15:168-179.
- Herawaty, R, N. Jamarun, M. Zain, Arnim and R.W.S. Ningrat. 2013. Effect of Supplementation *Sacharomyces cerevisiae* and *Leucaena leucocephala* on Low Quality Roughage Feed in Beef Cattle Diet. *Pakistan Journal of Nutrition* 12 (2): 182-184, 2013.
- Herrero, M., Thornton, P.K., Notenbaert, A.M., Wood, S., Msangi, S., Freeman, H.A., Bossio, D., Dixon, J., Peters, M., van de Steeg, J., Lynam, J., Rao, P.P., Macmillan, S., Gerard, B., McDermott, J., Seré, C. and Rosegrant, M. 2010. Smart Investments in Sustainable Food Production: Revisiting Mixed Crop-Livestock Systems. *Science* 327: 822–825.

- Hervás G, Álvarez Del Pino MC, Giráldez FJ, Mantecón AR and Frutos P. 2001. Effect of two types of tannin, in the presence or absence of PEG, on in vitro rumen fermentation in goats. Proc of the 9th Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on sheep and goat nutrition, nutrition and feeding strategies of sheep and goats under harsh climates, Hammamet (Tunisia), 8-10 November. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, INRAT (Tunisia), p.57.
- Hess, H. D., Tiemann, T. T., Noto, F., Carulla, J. E. and Kreuzer, M. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. International Congress Series, vol. 1293, pp. 164-7.
- Hess, H.D., Mera, M.L., Tiemann, T.T., Lascano, C.E. and Kreuzer, M. 2008. In vitro assessment of the suitability of replacing the low- tannin legume *Vigna unguiculata* with the tanniniferous legumes *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* or *Calliandra calothyrsus* in a tropical grass diet. Animal Feed Science and Technology 147(1-3), 105-115.
- Hollmann, M. and Beede, D.K. 2012. Comparison of effects of dietary coconut oil and animal fat blend on lactational performance of Holstein cows fed a high-starch diet. J. Dairy Sci. 95:1484–1499
- Holter, J.B., Haves, H.H., Urban, Jr. W.E. and Duthie, A.H. 1992. Energy balance and lactation response in Holstein cows supplemented with cottonseed with or without calcium soap. J. Dairy Sci. 75: 1480–1494.
- Holtshausen, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R. and Benchaar, C. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. J. Dairy Sci. 92: 2809–2821.
- Horigome, T, Kumar, R and Okamoto, K, 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. Br J Nutr, vol. 60, no. 2, pp. 275-85.
- Hristov, A.N., Lee, C., Cassidy, T., Heyler, K., Tekippe, J.A., Varga, G.A., Corl, B. and Brandt, R.C. 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on production and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 96: 1189-1202.
- Hristov, A.N., Lee, C., Cassidy, T., Long, M., Heyler, L., Corl, B. and Forster, R. 2011b. Effects of lauric and myristic acids on ruminal fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 94:382–395.

- Hu W, Liu J, Ye J, Wu Y, Guo Y. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 120, 333–339. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.02.029
- Huyen NT, Wanapat M, Navanukraw C. 2012. Effect of mulberry leaf pellet (MUP) supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility in beef cattle fed on rice straw-based diets. *Anim Feed Sci Technol*. 2012,175:8–15.
- Immig, I., Demeyer, D., Fiedler, D., Van Nevel, C. and Mbanzamihigo, L. 1996. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Arch. Anim. Nutr*. 49: 363–370.
- INRA, 1989. Ruminant Nutrition recommended allowance and Feed Tables. INRA, Paris, 1989
- IPCC. Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change. IPCC Fourth Assessment Report (AR4). 2007. Available online: http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg3/en/contents.html (accessed on 30 January 2012).
- Jayanegara, A., Leiber, F. and Kreuzer, M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. REVI EW ARTICLE. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 96 (2012) 365–375,
- Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H.P.S and Becker, K. 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *Anim. Feed Sci. Technol*. 150: 230–237.
- Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C. R., Marquardt, S., Kreuzer, M. and Leiber, F. 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 163, no. 2–4, pp. 231–43.
- Jean-Yves Dourmad, Cyrille Rigolot, Hayo van der Werf. 2008. Emission of greenhouse gas, developing management and animal farming systems to assist mitigation. *Pp*: 36-39. In *Proceedings of International Conference on Livestock and Global climate Change, 2008*, Editors: P Rowlinson, M Steele and A Nefzaoui, 17-20 May, 2008, Hammamet, Tunisia Cambridge Univesity press, May, 2008.

- Jennifer W, Mac A, Joe B, Anowarul I and Glenn S. 2013. The Benefits of Tannin-Containing Forages. Dept. of Plants, Soils and Climate, Utah State University.
- Jetana, T. C. Vonpipatana, S. Usawang and S. Sophon. 2011. Using treated *Leucaena* (*Leucaena Leucocephala*) leaves as supplements to Thai Brahman cattle giving a basal diet of rice straw. *J. Anim. Vet. Adv.* 10: 1054-1060.
- Johnson, DE and Ward, GM, 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 42, no. 1-2, pp. 133-41
- Johnson, E.D., Wood, A.S., Stone, J.B. and Moran Jr., E.T. 1972. Some effects of methane inhibition in ruminants (steers). *Can. J. Anim. Sci.* 52: 703-712.
- Jones RJ. 1994. Management of anti-nutritive factors - with special reference to leucaena. In: Gutteridge RC; Shelton HM, eds. *Forage Tree Legumes in opical Agriculture*. CABI, Wallingford, UK. p. 216-231.
- Jones RJ; Blunt CG; Holmes JHG. 1976. Enlarged thyroid glands in cattle grazing leucaena pastures. *Tropical Grasslands* 10:113-116.
- Jones RJ; Hegarty MP. 1984. The effect of different proportions of *Leucaena leucocephala* in the diet of cattle on growth, feed-intake, thyroid-function and urinaryexcretion of 3-hydroxy-4(1h)-pyridone. *Australian Journal of Agricultural Research* 35:317-325.
- Jones WT, Mangan JL. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J Sci Food Agric* 28,126.
- Jones WT, Mangan JL (1977). Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J Sci Food Agric* 28, 126.
- Jones, CR, Mowat, DN, Buchanan-Smith, JG and Macleod, GK, 1987. Methane fermentation residue as a protein supplement for beef cattle, *Biological Wastes*, vol. 19, no. 2, pp. 123-32.
- Kaspar, H.F. and Tiedje, J.M. 1981. Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen: nitrous oxide production and effect of acetylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:705-709.
- Kearl. L. C. 1982. *Nutrient Requirements of Ruminants in Developing Countries*. International Feedtuffs Institute. Utah Agricultural Experiment Station. Utah State University, Logan.

- Khanum, S. A., Yaqoob, T., Sadaf, S., Hussain, M., Jabbar, M. A., Hussain, H. N., Kausar, R. and Rehman, S. 2007. Nutritional evaluation of various feedstuffs for livestock production using *in vitro* gas method. Pakistan Vet. J., 27(3), 129-133.
- Khazaal, K., Dentinho, M. T., Riberio, J. M. and Orskov, E.R. 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and voluntary intake of hays. Anim. Prod. Sci., vol. 57, pp. 105-12.
- Knight, T., Ronimus, R.S., Dey, D., Tootill, C., Naylor, G., Evans, P., Molano, G., Smith, A., Tavendale, M., Pinares-Patino, C.S. and Clark, H. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 166: 101–112.
- Kolver, E.S. and Aspin, P.W. 2006. Supplemental fumarate did not influence milksolids or methane production from dairy cows fed high quality pasture. Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod. 66: 409–415.
- Koneswaran, G. and D. Nierenberg, 2008. Global farm animal production and global warming: Impacting and mitigating climate change. Pp:164-169. In Proceedings of International Conference on Livestock and Global climate Change, 2008, Editors: P Rowlinson, M Steele and A Nefzaoui, 17-20 May, 2008, Hammamet, Tunisia Cambridge Univesity press, May, 2008.
- Krishnamoorthy, U., H. Soller, H. Steigass and K. H. Menke. 1995. Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analysis and rumen inoculums studies *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol., 52: 177-188.
- Krueger, N.A., Adesogan, A.T., Staples, C.R., Krueger, W.K., Kim, S.C., Littell, R.C. and Sollenberger, L.E. 2008. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. J. Anim. Sci. 86: 882–889.
- Kumar R and Singh M. 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. J Agr Food Chem 32: 447-453.
- Kumar, R. and S. Vaithiyanathan, 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. Anim. Feed Sci. Technol., 30: 21-38.
- Kurihara, M., Osada, T., Nishida, T., Purnomoadi, A. and Yagi, K. 2009. Global emission rate of nitrous oxide from cattle themselves.

- <http://www.coalinfo.net.cn/coalbed/meeting/2203/papers/agriculture/AG054.pdf>.
- LaCount, D.W., Drackley, J.K., Cicela, T.M. and Clark, J.H. 1995. High oil corn as silage or grain for dairy cows during an entire lactation. *J. Dairy Sci.* 78: 1745–1754.
- Lee, C., Hristov, A.N., Heyler, K.S., Cassidy, T.W., Lapierre, H., Varga, G.A. and Parys, C. 2012b. Effects of metabolizable protein supply and amino acids supplementation on nitrogen utilization, production and ammonia emissions from manure in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 5253–5268.
- Leinmüller E, Steingass H, Menke KH. 1991. Tannins in ruminant feedstuffs. Biannual Collection of Recent German. Contributions Concerning Development through Animal Research 33: 9-62.
- Leng, R.A. 2008. *The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants*. A report to the department of climate change. Commonwealth Government of Australia, Canberra. <http://www.penambulbooks.com>.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Tatsuoka, N., Kanda, S., Kurokawa, Y. and Itabashi, H. 2004. Effect of cyclodextrin diallyl maleate on methane production, ruminal fermentation and microbes *in vitro* and *in vivo*. *Anim. Sci. J.* 75: 15–22
- Lovett, D.K., Bortolozzo, A., Conaghan, P., O’Kiely, P.O. and O’Mara, F.P. 2004. In vitro total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial rye grass cultivar. *Grass Forage Sci.* 59: 227–232.
- Lowry JB, McSweeney CS, Palmer B. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. *Australian Journal of Agricultural Research* 47: 829-842.
- Lynch, J.P., O’Kiely, P., Murphy, R. and Doyle, .2012. White-rot fungal digestion of maize stover components harvested at sequential maturities. In K. Kuoppala, M. Rinne and A. Vanhatalo, eds. *Proc. of the XVI Int. Silage Conf.* Hameenlinna, Finland, pp. 220–221. University of Helsinki, MTT Agrifood Research Finland.
- Machmüller, A. and Kreuzer, M. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 65–72.

- Machmüller, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric. Ecosyst. Environ.* 112: 107–114.
- Makkar HPS and Becker K. 1998. Adaptation of cattle to tannins: role of protein-rich proteins in oak-fed cattle. *Anim Sci* 67: 277-281.
- Makkar HPS, Blümmel M, Becker K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycol and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Brit J Nutr* 73: 897-913.
- Makkar HPS, Blümmel M, Becker K. 1995. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J Sci Food Agric* 69: 481-493.
- Makkar HPS, Singh B, Dawra RK. 1988. Effect of tannin-rich of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Brit J Nutr* 60: 287-296.
- Makkar, H.P.S. and Singh, B. 1987. Kinetics of urea hydrolysis and binding of ammonia to wheat straw during ammoniation by urea. *J. Dairy Sci.* 70: 1313–1317
- Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of tannins in tree foliage. FAO/IAEA Publication. Dordrecht, The Netherlands, H.P.S. Kluwer Academic Publishers
- Makkar, H.P.S., Blümmel, M. and Becker, K. 1995. *In vitro* effects and interactions of tannins and saponins and fate of tannins in rumen. *J. Sci. Food Agric.* 69: 481–493.
- Mangan JL. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr Res Rev* 1: 209-231.
- Manh, N. S., Hung, L. V., Cuong, V. C., Don N. V. and Thuy, N. TH. 2012. Effects of Eucalyptus (*E. Camaldulensis*) leaf powder (ELP) on rumen fermentation, feed digestibility and methane production in ruminants in *in vitro* gas production technique. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi, Viện Chăn nuôi, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, Số 36: 28-41.
- Mao, H., Wang, J., Zhou, Y. and Liu, J. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livest. Sci.* 129: 56–62.
- Martin C., Pomiès, D., Ferlay, A., Rochette, Y., Martin, B., Chilliard, Y., Morgavi, D.P. and Doreau, M. 2011. Methane output and rumen microbiota in dairy

- cows in response to longterm supplementation with linseed or rapeseed of grass silage- or pasture-based diets. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 71: 242–247.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M. and Chilliard, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86: 2642–2650.
- Mathew, B., Eastridge, M.L., Oelker, E.R., Firkins, J.L. and Karnati, S.K.R. 2011. Interactions of monensin with dietary fat and carbohydrate components on ruminal fermentation and production responses by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 396–409.
- McAllister, T.A. and Newbold, C.J. 2008. Redirecting Rumen Fermentation to Reduce Methanogenesis. *Animal Production Science*, 48, 7-13.
- McAllister, T.A., Mathison, E. and Cheng, K.J. 1996. Dietary, Environmental and Microbiological Aspects of Methane Production in Ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76, 231-243.
- McCourt, A.R.Y.T., Mayne, S. and Wallace, R.J. 2008. Effect of dietary inclusion of encapsulated fumaric acid on methane production from grazing dairy cows. In *Proceedings of British Society of Animal Science Annual Conference*. p. 64. British Society of Animal Science, Scarborough, UK.
- McCrabb, GJ and Hunter, RA, 1999. Prediction of methane emissions from beef cattle in tropical production systems. *Aust. J. Agric. Res.*, vol. 50, pp. 1335-9.
- McDonald, I. 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 96: 251-252
- McGinn, S.M., Chung, Y.-H., Beauchemin, K.A., Iwaasa, A.D. and Grainger, C. 2009. Use of corn distillers' dried grains to reduce enteric methane loss from beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 89: 409–413.
- McLeod MN (1974). Plant tannins - Their role in forage quality. *Nutr Abst Rev* 44: 803-812.
- McMahon, L. R., McAllister, T. A., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D., Coulman, B. E., Wang, Y. and Cheng, K. J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 80, no. 3, pp. 469-85
- McNaughton, L, 1987. Two levels of caffeine ingestion on blood lactate and free fatty acid responses during incremental exercise. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, vol. 83, no. 3, pp. 255 - 9.

- McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim Feed Sci Tech* 91: 83-93.
- McSweeney CS, Kennedy PM, John A. 1988. Effect of ingestion of hydrolysable tannins in *Terminalia oblongata* on digestion in sheep fed *Stylosanthes hamata*. *Aust J Agr Res* 39, 235-244.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M. and Krause, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim, Feed Sci, Technol*, 91, 83–93,
- McSweeney, C.S., Makkar, H.P.S. and Reed, J.D. 2003. Modification of rumen fermentation for detoxification of harmful plant compounds. In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Nutrition of Herbivores*, pp. 239–268. Merida, Yucatan, Mexico.
- Mehansho H, Butler LG, Carlson DM. 1987. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: 200 *P. Frutos et al. / Span J Agric Res* (2004) 2 (2), 191-202 interactions, induction and defence mechanisms. *Annu Rev Nutr* 7: 423-440
- Mei-Ju Lee, Sen-Yuan Hwang and Peter Wen-Shyng Chiou. 2000. Metabolizable energy of roughage in Taiwan. *Small Ruminant Research*. 36. (2000) 251-259.
- Mekoya A, Oosting, S.J., Fernandez-Rivera, S. and Van der Zijpp, A.J. 2008. Farmers' perceptions about exotic multipurpose fodder trees and constraints to their adoption. *Agrofor.Syst.* 73: 141–153.
- Menke, K. H., Raab L., Salewski, A., Steingass H., Fritz, D. and Schneider. W. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 92:217-222.
- Menke, K.H. and H. Steigass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, 28: 7-55.
- Michael J. Halliday, Jagadish Padmanabha, Chris S. Mcsweeney, Graham Kerven, and, H. Max Shelton. 2013. Leucaena toxicity: a new perspective on the most widely used forage tree legume. *Tropical Grasslands– Forrajes Tropicales* (2013) Volume 1, 1-11. www.tropicalgrasslands.info.
- Min BR, McNabb WC, Barry TN, Kemp, Waghorn PD, McDonald GC (1999). The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive

- efficiency and wool production in sheep during late summer and autumn. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 132: 323-334.
- Minitab soft ware version 14.0. USA. 2005.
- Mitsumori, M., Shinkai, T., Takenaka, A., Enishi, O., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Nonaka, I., Asanuma, N., Denman, S.E. and McSweeney, C.S. 2011. Responses in digestion, rumen fermentation and microbial populations to inhibition of methane formation by a halogenated methane analogue. *Br. J. Nutr.* 8: 1–10.
- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Grainger, C., Hannah, M.C., Ponnampalam, E.N. and Eckard, R.J. 2011. Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable or reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 254–264.
- Moss, A.R., Jouany, J. and Newbold, J. 2000. Methane Production by Ruminants: Its Contribution to Global Warming. *Annales De Zootechnie*, 49, 231-253.
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolyzable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91: 3-20.
- Mueller-Harvey I, McAllan AB. 1992. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. *Adv Plant Cell Biochem Biotechnol* 1, 151.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. A review. *J. Sci. Food Agric.* 86: 2010–2037.
- Murray, RM, Bryant, AM and Leng, RA, 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, vol. 36, no. 1, pp. 1-14
- Myambi B. Celestin and M. Mutimu. 2012. Effect of Supplementing Different Levels of *Leucaena diversifolia* Leaf Meal on Milk Yield of Crossbred Dairy Cows. *Research Journal of Dairy Sciences* 6(3-4): 19-21, 2(112) TSSN: 1993-5277.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van Soest, P.J. and Demeyer, D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In P.N. Hobson and C.S. Stewart, eds. *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 523–623. London, Blackie Academic and Professional.
- Narjisse H, Elhonsali MA, Olsen JD. 1995. Effects of oak (*Quercus ilex*) tannins on digestion and nitrogen balance in sheep and goats. *Small Ruminant Res* 18: 201-206.

- Nieves, D., Basilia Silva, O. Teran, C. Gonzalez and J. Ly. 2004. A note on the chemical composition and feeding characteristics of diets containing *Leucaena leucocephala* and *Arachis pintoi* for growing rabbits. *Livestock research for Rural development* 16 (12) 2004.
- Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG, Waghorn GC. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 125, 281-289.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G.C. and Charleston, W.A.G. 1998b. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet. Parasitol.* 80: 15–27.
- Niezen, J.H., Waghorn, G.C. and Charleston, W.A.G. 1998a. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Vet. Parasitol.* 28: 13–21.
- Nitipot, P. and Sommart, K. 2003. Evaluation of ruminant nutritive value of cassava starch industry by-products, energy feed sources and roughages using *in vitro* gas production technique. In: *Proceeding of Annual Agricultural Seminar for year 2003, KKU*, pp. 179-90.
- Njiadda, A.A. and Nasiru, A. 2010. *In vitro* gas production and dry matter digestibility of tannin-containing forages of semi-arid region of North-Eastern Nigeria. *Pak. J. Nutr.*, 9 (1): 60-66.
- Nolan, J.V., Hegarty, R.S., Hegarty, J., Godwin, I.R. and Woodgate, R. 2010. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. *Anim. Prod. Sci.* 50: 801–806.
- NRC. 1984. The nutrient requirements of beef cattle. Washington DC, USA.
- NRC. National Research Council. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 6th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- O'donovan L, Brooker JD. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiol* 147: 1025-1033.
- O'Mara, FP, Beauchemin, K, Kreuzer, M and McAllister, TA. 2008. Reduction of greenhouse gas emissions of ruminants through nutritional strategies. in P Rowlinson, M Steele and A Nevzaoui (eds), *Livestock and Global Climate Change*, Cambridge University Press, pp. 40-3

- Oosting, S.J., Boekholt, H.A., Los, M.H.M. and Leffering, C.P. 1993. Intake and utilization of energy from ammonia treated and untreated wheat straw by steers and wether sheep fed a basal ration of grass pellets and hay. *Anim. Prod.* 57: 227–236.
- Oosting, S.J., Mekoya, A., Fernandez-Rivera, S. and van der Zijpp, A.J. 2011. *Sesbania sesban* as a fodder tree in Ethiopian livestock farming systems: Feeding practices and farmers' perceptions of feeding effects on sheep performance. *Livest. Sci.* 139: 135–142.
- Oosting, S.J., van Bruchem, J. and Chen, X.B. 1995. Intake, digestion and small intestinal protein availability in relation to ammoniation of wheat straw with or without protein supplementation. *Br. J. Nutr.* 74: 247–268.
- Oosting, S.J., Vlemmix, P.J.M. and van Bruchem, J. 1994. Effect of ammonia treatment of wheat straw with or without supplementation of potato protein on intake, digestion and kinetics of comminution, rumen degradation and passage in steers. *Br. J. Nutr.* 72: 147–165.
- Orskov, E. R. and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, vol. 93, pp. 499-503.
- Owen, E., Smith, T. and Makkar, H. 2012. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries: A synthesis of an FAO e-conference. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174: 211–226
- Palmquist, D.L. and Jenkins, T.C. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63: 1–14.
- Parthasarathy Rao, P. and Blümmel, M. 2010. A note on the response of sheep to differently priced sorghum stover traded concomitantly and implications for the economy of feeding. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 10 (Suppl.1): 105–111.
- Parthasarathy Rao, P. and Hall, A.J. 2003. Importance of crop residues in crop-livestock systems in India and farmers' perceptions of fodder quality in coarse cereals. *Field Crop Res.* 84:189–198.
- Pascal Leterme. 2005. Chemical composition, nutritive value and voluntary intake of tropical tree foliage and cocoyam in pigs. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 1725-1732.
- Patra, A. K. and Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* 96,369–375.

- Patra, A.K. 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2700–2708.
- Patra, AK, Kamra, DN and Agarwal, N, 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 128, pp. 276–91.
- Pattanaik AK; Khan SA; Goswami TK. 2007. Influence of iodine on nutritional, metabolic and immunological response of goats fed *Leucaena leucocephala* leaf meal diet. *Journal of Agricultural Science* 145:395–405.
- Paustian K, Antle M, Sheehan J, Eldor P., 2006. Agriculture's Role in Greenhouse Gas Mitigation. Washington, DC: Pew Center on Global Climate Change.
- Pellikaan, W.F., Hendriks, W.H., Uwimana, G., Bongers, L.J.G.M., Becker, P.M. and one, J.W. 2011. A novel method to determine simultaneously methane production during *in vitro* gas production using fully automated equipment. *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 168, pp. 196–205.
- Pellikaan, W.F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, L.J.G.M., van Laarvan Schuppen, S., Plant, J. and Mueller-Harvey, I. 2011b. Evaluating effects of tannins on extent and rate of *in vitro* gas and CH₄ production using an automated pressure evaluation system (APES). *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 377–390.
- Pen, B., Sar, C., Mwenya, B., Kuwaki, K., Morikawa, R. and Takahashi, J. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129, 175–186.
- Perry, T.W. 1990. Dietary nutrient allowance for beef cattle. *Feedstuffs- Reference issue*, 62, 31: 46-56.
- Piluzza G, Sulasand L and Bullitta S. 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. John Wiley and Sons Ltd. *Grass and Forage Science*, 69, pp 32–48.
- Pinares-Patiño, C.S., Waghorn, G.C., Machmüller, A., Vlaming, B., Molano, G., Cavanagh, A. and Clark, H. 2007. Methane Emissions and Digestive Physiology of Non-Lactating Dairy Cows Fed Pasture Forage. *Canadian Journal of Animal Science*, 87, 601-613.
- Pinares-Patiño, C.S., Machmuller, A., Molano, G., Smith, A., Vlaming, J.B., Clark, H. 2008. The SF₆ tracer technique for measurements of methane emission from cattle—Effect of tracer permeation rate. *Can. J. Anim. Sci.* 2008, 88,

309–320.

- Preston, T. R and Willis, M..B. 1967. Intensive Beef Production from Sugar Cane.
- Promkot, C. and M. Wanapat. 2003. Ruminal degradation and intestinal digestion of crude protein of tropical protein resources using nylon bag technique and three-step in vitro procedure in dairy cattle. *Livestock Research for Rural Development* 15 (11) 2003.
- Rabiee, A.R., Breinhild, K., Scott, W., Golder, H.M., Block, E. and Lean, I.J. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 95: 3225–3247.
- Rahman, M. M, M. R. Islam and M. Islam. 1990. Development of Fodder production programme. 1st annual progress report, BLRI.
- Rajan, S. K. 1990. Nutritional Value of Animal Feeds and Feeding of Animals, ICAR, New Dehli
- Ramírez-Restrepo, C.A. and Barry, T.N. 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants.
- Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73(5), 1516-1528.
- Robbins CT, Hanley TA, Hagerman AE, Hjeljord O, Baker DL, Schartz CC and Mautz WW (1987). Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology* 68: 98-107.
- Roger F, Van der Werf H, Kanyarushoki C., 2007. Systemes bovins lait bretons: consommation d'énergie et impacts environnementaux sur l'air, l'eau et le sol. *Rencontres Recherches Ruminants* 14, 33-36.
- Romney, D. L., Cadario, F. C., Owen, E. and Murray, A. H. 1997. Comparison of parameters from the Theodorou gas production technique using nitrogen-free and nitrogenrich media as predictors of DM intake and digestibility. In: *In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants*, Occasional Meeting of the British Society of Animal Science, University of Reading, United Kingdom.
- Roy, S. and Rangnekar, D.V. 2006. Farmer adoption of urea treatment of cereal straws for feeding of dairy animals: a success in Mithila milkshed, India. *Livest. Res. Rural Dev.* 18. [http:// www.lrrd.org/lrrd18/8/roy18118.htm](http://www.lrrd.org/lrrd18/8/roy18118.htm).
- Russell, J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G., Van Soest, P.J. and Sniffen, C.J. 1992. A

- net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70: 3551–3561. Russell, J.B. and Wallace, R.J. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In P.N. Hobson and C.S. Stewart, eds. *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 246–282. London, U.K. Blackie Academic and Professional.
- Saffarsadeh, A., Vincze, L. and Csapó, J. 2000. Determination of some anti-nutritional factors and metabolisable energy in acorn (*Quercus branti*), *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* seeds as new poultry diets. *Acta Agraria Kaposvariensis*, vol. 4, no. 1, pp. 41-7.
- Saleem, M.A.M. 1998. Nutrient balance patterns in African livestock systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 71: 241–254.
- Salem, H. B., Nefzaoui, A., Salem, L. B., Tisserand, J. L., Ben Salem, H. and Ben Salem, L. 1999. Intake, digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Animal Feed Science and Technology* 78, 297-311.
- Sallam, S.M.A., Nasser, M.E.A., El-Waziry, A.M., Bueno, I.C.S. and Abdalla, A.L. 2007. Use of an *in vitro* Rumen Gas Production Technique to Evaluate Some Ruminant Feedstuffs. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 34-41.
- Sallam, S. M. A. 2005. Nutritive value assessment of the alternative feed resources by gas production and rumen fermentation *in vitro*. *Research Journal of Agriculture and Biological Science* 1(2): 200-209.
- Sansoucy, R., Aarts, G. and Leng, R.A. 1988. Molasses-urea blocks as a multivitamin supplement for ruminants. In R. Sansoucy, G. Aarts and T.R. Preston (eds). *Sugarcane as Feed*, vol. 2, pp. 263–278. Proc. of an FAO Expert Consultation held in Santo Domingo, 7-11 July 1986.
- Sar, C., Santoso, B., Mwenya, B., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H. and Takahashi, J. 2004. Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with β 1-4 galactooligosaccharides or nisin in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115: 129–142.
- Sarnklong, C., Cone, J.W., Pellikaan, W. and Hendriks, W. 2010. Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: a review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23: 680–692.
- SAS. 1998. SAS Inst. Inc, Cary, NC.
- Sawyer, M.S., Hoover, W.J. and Sniffen, C.J. 1974. Effects of a ruminal methane inhibitor on growth and energy metabolism in the ovine. *J. Anim. Sci.* 38:

908–914.

- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875–3883.
- Schiere, J.B. 1995. Cattle, straw and system control: a study of straw feeding systems. PhD Diss. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Schiere, J.B., Joshi, A.L., Seetharam, A., Oosting, S.J., Goodchild, A.V., Deinum, B. and van Keulen, H. 2004. Grain and straw for whole plant value: Implications for crop management and genetic improvement strategies. *Aust. J. Exp. Agric.* 40: 277–294
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM and Saura-Calixto F. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research* 53(S2): S310–S329
- Silanikove N, Nitsan Z, Perevolotsky A, (1994). Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*) by sheep. *J Agr Food Chem* 42, 2844–2847
- Simon Quigley, Dennis Poppi, Esnawan Budisantoso, Dahlanuddin, Marsetyo, Stu McLennan, Dicky Pamungkas, Tanda Panjaitan and Atien Priyanti. 2009. *Final Report. ACIAR Project*. Strategies to increase growth of weaned Bali calves. LPS/2004/023. 2009. ACIAR publilised, GPO Box 1571. Canberra, ACT. 2601, Australia.
- Simone, R., Parker, A. J. and Dunshea, F. R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*: 69 (2008) 299–322.
- Singh, B., A. Sahoo, R., Sharma and T. K. Bhat. 2005. Effect of poethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Animal feed science and technology*. Volumes 123–124, part 1, 30 September 2005, pp 351–364.
- Sliwinski, B.J., Kreuzer, M., Wettstein, H.R. and Machmuller, A. 2002. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plantextracts rich in tannins and saponins and associated emissions of nitrogen and methane. *Arch. Anim. Nutr.* 56: 379–392.
- Smith, O. B., O. A. Idown., V. O. Asaolu and O. Odunlami. 1991. Comparative rumen degradability of forages, browse, crop residues and agricultural by – products. *Livestock Research for Rural Development*, Volume 3, Number 2, June 1991.
- Sommart, K., Parker, D.S., Rowlinson, P. and Wanapat, M. 2000. Fermentation

- characteristics and microbial protein synthesis in an in vitro system using cassava, rice straw and dried ruzi grass as substrates. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.*, vol. 13, pp. 1094-101.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw Hill Book Co., New York, NY, USA.
- Steinfeld, H. and Hoffmann, I. 2008. Livestock, greenhouse gases and global climate change. Pp: 8-9. In: *Proceedings of International Conference on Livestock and Global climate Change, 2008*, Editors: P. Rowlinson, M. Steele and A. Nefzaoui, 17-20 May, 2008, Hammamet, Tunisia Cambridge, Univesity press, May, 2008.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M. and de Haan, C. 2006. *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. in Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italia.
- Steingass, H. and K. H. Menke. 1986. Schatzung des energetischen Futterwertes aus der in vitro mit Pansensaft bestimmten Gasbildung und der chemischen Analyse. *Tierernahrung*, 14:251.
- Sudana, I.B. and Leng, R.A. 1986. Effects of supplementing a wheat straw diet with urea or a urea molasses block and or cottonseed meal on intake and live weight change of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16: 25–35
- Sundstøl, F. and Owen, E. 1984. *Straw and other fibrous by-products as feed. Developments in Animal and Veterinary Sciences*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier
- Swain T. 1979. Tannins and lignins. In: Rosenthal, G.A. and Janzen, D.H. (Eds.), *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, Academic Press, New York, pp. 657–682.
- Takahashi, J., Ikeda, M., Matsuoka, S. and Fujita, H. 1998. Prophylactic effect of L-cysteine to acute and subclinical nitrate toxicity in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 74: 273–280.
- Tan ND, Wanapat M, Uriyapongson S, Cherdthong A, Pilajun R. 2012. Enhancing mulberry leaf meal with urea by pelleting to improve rumen fermentation in cattle. *Asian-Aust J Anim Sci* 2012,25:452–461.
- Tarawali.S., Herrero, M., Descheemaeker, K, Grings, E. and M. Blummel, 2011. Pathways for sustainable development of mix crop livestock systems: Taking a livestock and pro-poor approach. *Livestock Science* 139, 11-21
- Tekippe, J.A., Hristov, A.N., Heyler, K.S., Cassidy, T.W., Zheljazkov, V.D., Ferreira, J.F.S., Karnati, S.K. and Varga, G.A. 2011. Rumen fermentation

- and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 5065–5079.
- Terrill TH, Windham WR, Hoveland CS and Amos HE (1989). Forage preservation method influences on tannin concentration, intake, and digestibility of sericea lespedeza by sheep. *Agron., J.* 81: 435–439.
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F. and Barry, T.N. 1992. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci. Camb.* 119: 265–273.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Wolley, D.J., McNabb, W.C. and Barry, T.N. 1994. Assay and digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannin in the gastro intestinal tract of sheep. *Br. J. Nutri.* 72: 467–477.
- Tesema, Z., Baars M. R. T. and Alemu Yami. 2002. Effect of plant height at cutting, source and Level of fertilizer on yield and nutritional Quality of Napier grass (*Pennisetum purpureum* (L.) Schumach.) *African Journal of Range and Forage.*
- Thorne P.S., 2007. Environmental health impacts of concentrated animal feeding operations: anticipating hazards searching for solutions. *Environ Health Perspect* 115:296-297.
- Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Kreuzer, M. and Hess, H. D. 2008. The ruminal degradability of fibre explains part of the low nutritional value and reduced methanogenesis in highly tanniniferous tropical legumes, *J. Sci, Food Agric*, 88, 1794–1803.
- Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Wettstein, H.R., Mayer, A.C., Kreuzer, M. and Hess, H.D. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. *Animal* 2 (05), 790-799.
- Tomkins, N.W., Colegate, S.M. and Hunter, R.A. 2009. A bromochloromethane formulation reduces enteric methanogenesis in cattle fed grain-based diets. *Anim. Prod. Sci.* 49: 1053–1058.
- Traore, I. A, G. C. Akouedegni, S. Babatounde, R. H. Bosma. 2010. Effects of protein supplementation during the dry season on the feed intake and performances of Borgou cows in the sudanian zone of Benin. *Adv. Anim. Biosci.* 1: 449-459.
- Udo, H.M.J., Aklilu, H.A., Phong, L.T., Bosma, R.H., Budisatria, I.G.S., Patil, B.R., Samdup, T. and Bebe, B.O. 2011. Impact of intensification of

- different types of livestock production in smallholder crop-livestock systems. *Livest. Sci.* 139: 22–30.
- Ungerfeld, E.M., Kohn, R.A., Wallace, J. and Newbold, C.J. 2007. Meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *J. Anim. Sci.* 85: 2556–2563.
- Ushida, K and Jouany, JP, 1996. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 23, pp. 129-32.
- Van Nevel, C. J., D. I. Demeyer, H. K. Henderickx, and J. A. Martin. 1970. A simple method for the simultaneous determination of gas production and volatile fatty acid concentration in the rumen. *Zeitschr. Tierphys. Tierernahr. Futtermittelk.* 26, 91–100.
- Van Zijderveld, S.M., Gerrits, W.J.J., Apajalahti, J.A., Newbold, J.R., Dijkstra, J., Leng, R.A. and Perdok, H.B. 2010. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J. Dairy Sci.* 93: 5856–5866.
- Van Zijderveld, S.M., Dijkstra, J., Perdok, H.B., Newbold, J.R. and Gerrits, W.J.J. 2011c. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 3094–3104.
- Van Zijderveld, SM, Dijkstra, J, Gerrits, WJJ, Newbold, JR and Perdok, HB, 2010a. Dietary nitrate persistently reduces enteric methane production in lactating dairy cows. paper presented to Greenhouse gases and animal agriculture conference, Banff, Canada, October 3-8, 2010
- Van Zijderveld, SM, Gerrits, WJJ, Apajalahti, JA, Newbold, JR, Dijkstra, J, Leng, RA and Perdok, HB, 2010b. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 12, pp. 5856-66
- Virapol Jamsawat, Suranee Laowattanakul, and Jaruwat Chinsuwan. 2010. Efficiency of Using Cassava Chip as Based Energy and Leucaena Leaf as Protein Supplement for Dairy Heifer Feed. Pp: 328-333. RMUTP Research Journal Special Issue. The 4th Rajamangala University of Technology International Conference.

- Waghorn G. 1996. Condensed tannins and nutrient absorption from the small intestine. Proc of the 1996 Canadian Society of Animal Science Annual Meeting, Lethbridge, Canada (Rode L.M., ed.). pp. 175-194.
- Waghorn GC and McNabb WC. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. Proceedings of the Nutrition Society 62, 383-392.
- Waghorn GC, Reed JD and Ndlovu LR. 1999. Condensed tannins and herbivore nutrition. In Proceedings of the XVIIth International Grasslands Congress 3: 153-156.
- Waghorn GC, Shelton ID and McNabb WC. 1994a. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its Tannins and ruminant nutrition on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. J Agr Sci 123: 99-107.
- Waghorn GC, Shelton ID, McNabb WC and McCutcheon SN. 1994b. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. J Agricult Sci 123, 109.
- Waghorn GC, Tavendale MH and Woodfield DR. 2002. Methanogenesis from forages fed to New Zealand ruminants. Proceedings of the New Zealand Grassland Association 64: 167-171.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and challenges. Animal Feed Science and Technology, vol. 147, no. 1-3, pp. 116-39.
- Waghorn, GC, Tavendale, MH and Woodfield, DR, 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. Proc .N. Z. Grassland Assoc., vol. 64, pp. 167-71.
- Wahyuni, S., Yulianti, E.S., Komara, W., Yates, N.G., Obst, J.M. and Lowry, J.B., 1982. The performance of Ongole cattle offered either grass, sun-dried *Leucaena leucocephala* or varying proportions of each. Trop. Anim. Prod., 7: 275-282
- Walli, .K. 2011. Biological treatment of straws. In Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries, pp. 57-61. Proceedings of the FAO electronic conference, 1-30 September 2010, Rome, Italy.
- Wanapat, M. 2001. Role of cassava hay as animal feed in the tropics. In: Proc. Intern. Workshop on "Current research and development on Use of cassava as Animal Feed, held in Khon Kaen Thailand, July 23-24, 2001. pp. 13 -20

- Wang Y, Douglas GB, Waghorn GC, Barry TN and Foote AG. 1996. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the lactation performance in ewes. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 126: 353-362.
- Wang, C.J., Wang, S.P. and Zhou, H. 2009. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation and methane emission from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148: 157–166.
- Watson, R. 2008. Climate Change: An environmental, development and security issue. Pp: 6-7. In: *Proceedings of International Conference on Livestock and Global climate Change, 2008*, Editors: P. Rowlinson, M. Steele and A. Nefzaoui, 17-20 May, 2008, Hammamet, Tunisia Cambridge, Univesity press, May, 2008.
- Weiss, W.P and Wyatt, D.J. 2000. Effect of oil content and kernel processing of corn silage on digestibility and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 351–358.
- Whitlock, L.A., Schingoethe, D.J., Hippen, A.R., Kalscheur, K.F. and AbuGhazaleh, A.A. 2003. Milk production and composition from cows fed high oil or conventional corn at two forage concentrations. *J. Dairy Sci.* 86: 2428–2437.
- Wolin, MJ, Miller, TL and Stewart, CS, 1997. Microbe-microbe interactions. in P Hobson and C Stewart (eds), *The rumen microbial ecosystem* London, pp. 469-91.
- Wood, T.A., Wallace, R.J., Rowe, A., Price, J., Yáñez-Ruiz, D.R., Murray, P. and Newbold, C.J. 2009. Encapsulated fumaric acid as a feed ingredient to decrease ruminal methane emissions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152: 62–71.
- Woodward A and Reed JD. 1989. The influence of polyphenolics on the nutritive value of browse: a summary of research conducted at ILCA. *ILCA Bull* 35, 2.
- Woodward, S.L., Waghorn, G.C. and Thomson, N.A. 2006. Supplementing dairy cows with oils to improve performance and reduce methane – does it work? *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 66: 176–181.
- Yves Froehlich, Thai Van Hung. 2001. - vi.wikipedia.org/wiki/Săn.
- Zemmelink, G., Ifar, S. and Oosting, S.J. 2003. Optimum utilization of feed resources: model studies and farmers' practices in two villages in East Java, Indonesia. *Agric. Syst.* 76: 77–94.
- Zhou, Y.Y., Mao, H.L., Jiang, F., Wang, J.K., Liu, J.X. and McSweeney, C.S. 2011a. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference

to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167: 93–100.

Zinash, S., Seyoum Bediye., Lulseged Gebrehiwot and Tadesse, T. 1995. Effect of harvesting stage on yield and quality of natural pasture in the central highlands of Ethiopia. Addis Ababa, Ethiopia. In: *Proceedings of 3rd National Conference of the Ethiopian Society of Animal Production*. 27-29 April 1995. pp. 316-322.

PHỤ LỤC

Qui trình thí nghiệm sinh khí *in-vitro* gas production
(Menker và Steingass, 1988)

** Chuẩn bị mẫu*

- Nghiền mẫu đến 1mm.
- Khối lượng mẫu cho một xilanh: 200 ± 5 mg. Mẫu đặt vào phần cuối của xilanh.
- Bôi trơn pít tông bằng vasolin và đẩy pít tông sát đến mẫu sau đó đẩy xilanh
- Xilanh chứa mẫu phải đặt trong tủ ấm ở $38-39^{\circ}\text{C}$ qua đêm và tiếp tục để trong tủ ấm ở 38°C cho đến khi lấy dịch dạ cỏ và chuẩn bị xong dung dịch đệm.

** Vị trí của xilanh*

- Xi lanh không chứa mẫu (blank) và mẫu chuẩn, cần phải đặt vào đầu, giữa và cuối của giá xi lanh khi thí nghiệm.
- Mẫu nghiền cứu cần lần nhắc lại 3 lần và phải đặt tách biệt ở đầu, giữa và cuối của giá ống nghiệm.

** Các dung dịch cần có****Dung dịch khoáng đa lượng***

5,7 g Na_2HPO_4
 6,2 g KH_2PO_4
 0,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 Hoà với nước cất thành 1 lit dung dịch

Dung dịch đệm 1

35 g NaHCO_3
 4 g $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$
 Hoà với nước cất thành 1 lit dung dịch

Chuẩn bị dung dịch đệm 2

474 ml nước cất
 0,12 ml dung dịch khoáng vi lượng
 237 ml dung dịch đệm 1
 237 ml dung dịch khoáng đa lượng
 1,22 ml dung dịch resazurin

Dung dịch khoáng vi lượng

13,2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 10 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 0,8 g $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 Hoà với nước cất thành 100 ml

Dung dịch Resazurin

100 mg resazurin
 Hoà với nước cất thành 100 ml

Dung dịch khử

2 ml NaOH 1N
 285 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 47,5 ml nước cất

** Dung dịch đệm*

- Từng phần của dung dịch đệm cần phải được chuẩn bị trước khi tiến hành thí nghiệm.

- Chuẩn bị dung dịch đệm 2 (dung dịch tươi ngay trước khi làm thí nghiệm) cho mỗi lần thí nghiệm (trộn các dung dịch đã được chuẩn bị vào bình tam giác).

** Cách pha dung dịch đệm 2*

Dung dịch (ml)	Lượng dung dịch cần tạo ra (ml)								
	500	750	1000	1200	1300	1400	1500	1700	2000
Nước cất	237,5	356	475	570	617,5	665	712,5	831	950
DD đệm 1	120	180	240	288	312	336	360	420	480
Đa khoáng	120	180	240	288	312	336	360	420	480
Vi khoáng	0,06	0,090	0,12	0,144	0,156	0,168	0,180	0,210	0,240
Resazurin	0,61	0,92	1,22	1,46	1,59	1,71	1,83	2,14	2,44
<i>Dung dịch khử</i>									
Nước cất	23,8	35,7	47,5	57,1	61,9	66,6	71,3	83,2	95
NaOH 1N	1,0	1,5	2,0	2,4	2,6	2,8	3,0	3,5	4,0
Na ₂ S.9 H ₂ O	0,168	0,252	0,336	0,360	0,437	0,470	0,504	0,588	0,672

Tuỳ theo số xilanh mà quyết định số lượng dung dịch đệm 2 cần pha

Lưu ý: Dung dịch đệm 2 chỉ trộn trước khi tiến hành mỗi lần thí nghiệm

- Làm ấm đến 38°C sau đó cho dung dịch khử vào
 - Đặt bình tam giác có dung dịch đệm vào bể nước có khuấy từ ổn định nhiệt 39°C trong 25-30 phút sau đó cho dung dịch khử vào, sục khí CO₂ vào dung dịch cho đến khi mẫu dung dịch chuyển sang màu hồng sau đó sáng.
- pH của dung dịch nên là 7-7,3.

** Dịch dạ cỏ*

- Dịch dạ cỏ từ 2 bò được đổ vào 1 bình, dịch phải được giữ ấm 38-39° C.
- Lọc bỏ những hạt thức ăn lớn bằng vải xô.
- Tỷ lệ dung dịch đệm 2: dịch dạ cỏ là: 2: 1. Dịch hỗn hợp của 2 bò với số lượng tương đương được trộn đều và cho vào bình tam giác với dung dịch đệm 2 theo tỷ lệ 2:1.

- Bình tam giác phải giữ trong bình nước ấm 38-39°C, liên tục sục khí CO₂ và khuấy đều cho đến khi đã chuẩn bị xong xilanh. pH nên: 7-7,3.

* *Chuẩn bị thí nghiệm.*

- Lấy 2 lần, mỗi lần 30 ml bằng pipet để bỏ đi nhằm đảm bảo không có không khí trong bề mặt xilanh.

- Lấy 30 ml hỗn hợp dịch dạ cỏ và dung dịch đệm cho vào xilanh đã có mẫu đặt ở 39°C, giữ xilanh đầy không khí ra ngoài một cách nhẹ nhàng, đặt xilanh vào tủ ấm có quạt đối lưu hoặc Water Bath đảm bảo nhiệt độ luôn là 39°C.

- Ghi chép số ml trên xilanh ở thời điểm bắt đầu 0 giờ.

- Ghi chép số ml khí trên xilanh ở các thời điểm thích hợp.

- Cho khí thoát ra nếu lượng khí trong xi lanh >60 ml.

Thời gian đọc có thể được lập kế hoạch như sau:

<i>Thời điểm đọc (giờ)</i>	<i>Ngày giờ</i>
0	9 giờ sáng ngày thứ nhất
3	12 giờ trưa ngày thứ nhất
6	15 giờ chiều ngày thứ nhất
12	21 giờ tối ngày thứ nhất
24	9 giờ sáng ngày thứ hai
48	9 giờ sáng ngày thứ ba
72	9 giờ sáng ngày thứ tư
96	9 giờ sáng ngày thứ năm

Tính toán:

1. B_{mr}: trung bình của mẫu trắng (blank) mỗi lần đọc.

2. G_h: Gas sản xuất do tiêu hoá mẫu ở các thời điểm khác nhau.

3. G_{hr}: Gas đọc tại các thời điểm.

4. G_{hr-1}: Gas đọc tại các thời điểm trước khi xác định G_{hr}.

$$G_h = G_{hr} - G_{h0r} - B_{mr} + G_{hr-1}$$

Sau khi loại bỏ khí khỏi xilanh thì tính toán như sau:

5. G_{hr} = Gas sản xuất tại lúc đọc - Giá trị đọc sau khi loại bỏ khí lần đọc cuối cùng.

6. B_{mr}: Giống như G_{hr} ; $G_h = G_{hr} - B_{mr} + G_{hr-1}$