

DISS. ETH Nr. 27153

The influence of dietary supplementation of temperate climate tannin-containing plants on digestion and nitrogen metabolism of dairy cows in low-input systems

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCE of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Alexandra Nastasja Kapp Bitter

MSc Veterinary Medicine, University of Berne

Born on 8 February 1987

Citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Michael Kreuzer, examiner
Dr. Florian Leiber, co-examiner
Prof. Dr. Martin Gierus, co-examiner

2020

Summary

Phenols occurring in plants, especially tannins, are assumed to lower ammonia production in the rumen through binding on dietary protein. Plants with elevated tannin content could, therefore, be used instead of energy-rich diet compounds to lower the metabolic stress for cows in situations of excessive protein in the forage. This could save arable land for food instead of feed production and directs towards sustainable milk production. It was the objective of this thesis to test, if tannin-containing temperate climate meadow plants are able to influence the digestion and nitrogen metabolism of dairy cows and if this approach can be confirmed under practical conditions. One *in vitro*, two *in vivo* experiments on-farm with in total 59 dairy cows and one *in vivo* experiment on research station with 24 dairy cows were conducted during this project.

In the *in vitro* experiment, 35 temperate climate meadow plant species were investigated for their potential to reduce the ammonia formation using the Hohenheim Gas Test. The plants were harvested late during seed production and incubated together with *Lolium perenne* and *Medicago sativa* in a ratio of 0.3:0.4:0.3. They were also analysed for their nutrient and phenolic contents. A negative relationship between total extractable phenols, respectively total tannins and ammonia formation was found. The ammonia concentration in the incubation fluid, the gas production and the *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) were compared with the basal mixture, consisting only of *Lolium perenne* and *Medicago sativa* in a ratio of 0.57:0.43. Nineteen of the tested plants lowered the ammonia concentration in the incubation fluid and 17 plants had a higher IVOMD after 24 hours of incubation than the basal mixture. Among the tested plants, seven (*Galium verum*, *Leontodon hispidus*, *Lotus corniculatus*, *Onobrychis viciifolia*, *Plantago lanceolata*, *Sanguisorba minor* and *Scabiosa columbaria*) lowered the ammonia production without impairing the *in vitro* fermentation in general. This indicated their potential as beneficial feed supplements in situations of excessive protein in forage.

Two of the *in vivo* experiments were conducted on an organic low-input dairy cow farm during phases of protein-rich pasture, the first in autumn and the second in spring. In both experiments, all cows were kept together in one herd. In the first one, two of the three groups received daily 2 kg of sainfoin pellets and, with that, approximately 70 g of condensed tannins. One of these groups received the sainfoin pellets during 35 days, the other one intermittently during 2 x 5 days. The analysed parameters were compared to those of a third group, which was fed with ryegrass pellets instead and served as control. Small positive effects on the milk protein and fat yield, as well as higher ratio of purine derivatives to creatinine were found when offering the pellets intermittently over short periods. Both sainfoin treatments adversely impacted the estimated fibre digestion. The results of this first *in vivo* experiment suggest that the application of sainfoin pellets over only short periods is more efficient to influence the protein metabolism than an application over a longer period.

In the second *in vivo* experiment, ryegrass pellets (*L. perenne*) containing 0, 50 or 100 g/kg of chestnut tannin extract (*Castanea sativa* Miller), which consists mainly of hydrolysable tannins, were fed in the amount of 2 kg per day and cow. This resulted in approximately 32.2 and 106.6 additional total tannins per cow and day for the supplemented groups. The voluntary intake of pellets with 100 g/kg chestnut tannin extract was partly compromised in the cows. Feeding pellets containing chestnut tannin extract resulted in no measurable effects on the protein metabolism.

The third *in vivo* experiment was conducted on the research station of AgroVet Strickhof, equipped with facilities allowing to control feed intake and separate sampling of urine and faeces and therefore to determine the nitrogen balance. The experiment was conducted with two consecutive runs, each with 12 dairy cows. As test plants, *S. minor* (small burnet), *L. corniculatus* (birdsfoot trefoil) and *P. lanceolata* (plantain) were chosen based on the result of the *in vitro* experiment (Chapter 2). The experimental plants were mixed at 80 g/kg dry matter (DM) into a total mix ration consisting of grass and maize silage, protein-mix, hay and straw. The feed of the control group was supplemented with ryegrass (*L. perenne*). The mixtures were offered *ad libitum* to three cows per run. Per day, the treatment groups (*S. minor*, *L. corniculatus*, *P. lanceolata*) had a higher intake of 306, 35 and 31 g total tannins, 38, 36 and 24 g condensed tannins and 268, 0 and 8 g hydrolysable tannins per day compared to the control group, which received ryegrass instead. With *P. lanceolata*, the milk protein content was impaired, whereas *S. minor* shifted the excretion of nitrogen from urine to faeces and reduced the milk urea content.

All three *in vivo* experiments were conducted considering farm practice conditions. It did not seem to be feasible, to feed higher amounts of experimental plants because of limitations from the economic (costs and profit), the animal (intake respectively palatability and performance) and the plant (availability and nutrient content) side. Anyway, integrating *S. minor* into the diet was successful and shifted the nitrogen excretion from urine to faeces. Therefore, this plant could be an interesting option for integrating it into dairy cattle diets to buffer excessive protein in forage.

Zusammenfassung

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, insbesondere Tannine, binden an Futterproteine und vermindern so die Ammoniakbildung im Pansen. Pflanzen mit erhöhten Gehalten an Tanninen könnten daher anstelle energiereicher Futterzusätze genutzt werden, um die Stoffwechselbelastung von Kühen während Eiweissüberschüssen im Futter vom Grasland zu reduzieren. Somit könnte wertvolle Ackerbaufläche für den Anbau von Nahrungs- statt Futtermittel genutzt werden und ein weiterer Schritt in Richtung Nachhaltigkeit bei der Milcherzeugung gemacht werden. Das Ziel dieser Dissertation war zu testen, ob mit tanninhaltigen Pflanzen aus der gemässigten Klimazone ein Einfluss auf die Verdauung und den Stickstoffstoffwechsel der Milchkühe erreicht und in die Praxis übertragen werden kann. Während diesem Projekt fanden ein *in vitro*, zwei *in vivo* Versuche auf einem Landwirtschaftsbetrieb mit insgesamt 59 Milchkühen und ein *in vivo* Versuch auf einer Forschungsstation mit 24 Milchkühen statt.

Während des *in vitro* Versuchs wurden 35 einheimische Wiesenkräutern und -leguminosen mittels Hohenheimer Futterwert-Test auf ihr Potential, die Ammoniakbildung zu reduzieren, untersucht. Die Pflanzen wurden in der Phase der Samenbildung geerntet und zusammen mit *Lolium perenne* und *Medicago sativa* im Verhältnis von 0.3 zu 0.4 zu 0.3 inkubiert. Ebenfalls wurden Analysen zu ihren Nährstoff- und Phenolgehalt durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben einen negativen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an extrahierbaren Phenolen bzw. Gesamttanninen und der Ammoniakbildung. Die Ammoniakkonzentration der Inkubationsflüssigkeit, die Gasproduktion und die *in vitro* Verdaulichkeit der organischen Substanz (IVOMD) wurden verglichen mit den Werten der Kontrollmischung, bestehend aus *Lolium perenne* und *Medicago sativa* im Verhältnis von 0.57 zu 0.43. Im Vergleich zu der Kontrolle, führten 19 der Testpflanzen zu einer geringeren Ammoniakkonzentration der Inkubationsflüssigkeit und 17 Pflanzen zu einer höheren IVOMD nach 24 Stunden Inkubationszeit. Sieben der analysierten Pflanzen (*Galium verum*, *Leontodon hispidus*, *Lotus corniculatus*, *Onobrychis viciifolia*, *Plantago lanceolata*, *Sanguisorba minor* and *Scabiosa columbaria*) verminderten die Ammoniakproduktion, ohne die *in vitro* Fermentation im Allgemeinen negativ zu beeinträchtigen. Sie könnten somit möglicherweise eine sinnvolle Futterergänzung bei Proteinüberschüssen im Grundfutter sein.

Zwei der *in vivo* Versuche fanden auf einem biologisch geführten Milchkuhbetrieb statt. Der erste wurde im Herbst und der zweite im Frühling durchgeführt, jeweils also während Zeiten mit hohem Eiweissgehalt der Weidegräser. In beiden Experimenten wurden alle Versuchskühe zusammen in einer Herde gehalten. Im ersten erhielten zwei der drei Versuchsgruppen 2 kg Esparsette pro Tag und damit ungefähr 70 g kondensierte Tannine. Eine der Gruppen erhielt diese Pellets während 35 Tagen, die andere während 2 x 5 Tagen mit einer Unterbrechung von einer Woche. Die analysierten Parameter wurden mit denjenigen einer dritten Gruppe verglichen, die Anstelle von Esparsette Raigras (*Lolium perenne*) in Pelletform erhielt und als Kontrollgruppe fungierte. Bei der Gruppe, die Esparsette über die

zwei kurzen Zeiträume erhielt, wurden gering positive Effekte auf Milchprotein- und Milchfettmenge pro Tag sowie ein höheres Purinderivat zu Kreatinin-Verhältnis im Harn nachgewiesen. Die Faserverdauung war bei beiden Esparsette-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe beeinträchtigt. Das Resultat dieses ersten Experiments lässt darauf schließen, dass eine Verfütterung von Esparsettenpellets über eine kurze Zeitspanne einen deutlicheren Effekt auf den Proteinstoffwechsel hat wie die Verabreichung über einen längeren Zeitraum.

Im zweiten *in vivo* Versuch wurden Raigras-Pellets (*L. perenne*) mit 0, 50 oder 100 g/kg Kastanienextrakt (*Castanea sativa* Miller), der vor allem aus hydrolysierbaren Tanninen besteht, angereichert und in einer Menge von 2 kg pro Kuh und Tag verfüttert. Das führte zu einer erhöhten Aufnahme von 32.2 und 106.6 g Tanninen pro Tag und Kuh für die supplementierten Gruppen. Die Kühe verweigerten teilweise die Aufnahme der Pellets mit 100 g Kastanienextrakt/kg Pellet. Durch das Verfüttern der Pellets mit Kastanienextrakt konnten im Vergleich zu der Kontrolle keine messbaren Einflüsse auf die Stickstoffverwertung festgestellt werden.

Der dritte *in vivo* Versuch fand auf der Forschungsstation AgroVet Strickhof statt, wo die genaue Kontrolle der Futtermittelaufnahme und die separate Sammlung von Kot und Urin und somit die Bestimmung der Stickstoffbilanz möglich war. Dieser Versuch wurde in zwei aufeinanderfolgenden Durchgängen mit je 12 Kühen durchgeführt. Basierend auf den Resultaten des *in vitro* Experiments wurden *S. minor* (kleiner Wiesenknopf), *L. corniculatus* (Hornklee) und *P. lanceolata* (Spitzwegerich) als Versuchspflanzen gewählt. Jeweils 80 g der Testpflanze wurden pro Kilo Mischration, bestehend aus Gras- und Maissilage, proteinreichem Kraftfutter, Heu und Stroh, eingemischt. In das Futter der Kontrollgruppe wurde die gleiche Menge Raigras (*L. perenne*) zugesetzt. Die Mischungen wurden pro Durchgang je drei Kühen *ad libitum* angeboten. Die Zugabe von *S. minor*, *L. corniculatus* und *P. lanceolata* und führte zu einer höheren Aufnahme pro Tag und Kuh von 306, 35 und 31 g Gesamttanninen, 38, 36 und 24 g kondensierten und 268, 0 und 8 g hydrolysierbaren Tanninen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe beeinflusste die Zugabe von *P. lanceolata* den Milchproteingehalt negativ. Mit *S. minor* konnte die Stickstoffausscheidung vom Harn in den Kot verschoben und der Milchwahnharnstoffgehalt gesenkt werden.

Alle drei *in vivo* Versuche wurden im Hinblick auf die mögliche Umsetzung in die Praxis durchgeführt. Der Einsatz höherer Mengen der Versuchspflanzen erschien daher aufgrund der Ökonomie (Kosten und Profit), der Tiere (Schmackhaftigkeit und Leistung) und der Pflanzen (Verfügbarkeit und Nährstoffgehalte) als nicht praktikabel. Trotzdem erwies sich die Zufütterung von *S. minor* erfolgreich und führte zu einer Verschiebung der Stickstoffausscheidung vom Urin in den Kot. Diese bislang kaum beachtete Pflanze kann daher als interessante Option für die Integration in die Milchviehfütterung gesehen werden, um Proteinüberschüsse im Stoffwechsel abzapuffern.