

# LOS ALCANOS EN LA ESTIMACION DEL CONSUMO DE FORRAJE Y COMPOSICION BOTANICA DE LA DIETA DE ANIMALES EN PASTOREO <sup>a</sup>

Alberto Torres Rodríguez <sup>b</sup>

## RESUMEN

Torres R A. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 2 1998, pp. 151-158. El conocimiento de la composición de la dieta y consumo de animales en pastoreo es de interés primario para investigadores y técnicos involucrados en producción animal. La estimación de estos parámetros en animales en pastoreo es difícil por la escasez de metodologías prácticas y confiables. Los alcanos, sustancias hidrocarbonadas presentes en la cutícula vegetal, representan una alternativa para lograr estimaciones tanto del consumo como de la composición botánica de la dieta de animales en pastoreo. Estos compuestos se presentan en concentraciones diferentes entre las especies vegetales, lo que permite que cada dieta presente un patrón diferente de concentración de los mismos compuestos en las heces. Procedimientos de ecuaciones simultáneas o de mínimos cuadrados ayudan a realizar tales estimaciones. Cuando se aplica un alcano sintético, como marcador externo, se puede calcular la cantidad de alimento consumido. Se discuten aspectos de metodología y avances tecnológicos para facilitar la aplicación de esta nueva técnica. La tecnología de alcanos presenta ventajas en la estimación de la composición botánica y del consumo de alimento de animales en pastoreo por su facilidad de aplicación sin pérdida de confiabilidad.

**PALABRAS CLAVE:** Alcanos, Consumo de alimento, Composición botánica de la dieta, Herbívoros.

## INTRODUCCION

La estimación de la composición de la dieta, así como del consumo voluntario de animales en pastoreo, es de interés común para investigadores involucrados con la producción animal. Sin embargo, ésta es una difícil tarea, ya que no existen métodos confiables así como convenientes para estimar la composición botánica de la dieta consumida y su cantidad (1,2). De hecho, algunas pruebas para estimar la composición de la dieta de animales herbívoros, tales como la técnica microhistológica, demanda mucho tiempo, sin llegar a presentar resultados altamente confiables debido a diferencias en la digestibilidad entre especies vegetales. Una

nueva técnica para la estimación tanto de la composición botánica de la dieta de herbívoros como de su consumo es aquella basada en la presencia de alcanos (3). Estos son hidrocarburos saturados de diferentes longitudes de cadena, generalmente impar, con valores casi nulos de alcanos de cadena par, presentes en las cutículas de las plantas (3,4).

A mediados de los años ochenta, Mayes *et al* (5) propusieron el uso de estas ceras cuticulares de los vegetales o alcanos para estimar el consumo de forraje. Esta técnica se basa en el hecho de que alcanos de cadena impar y diferente longitud se encuentran de manera natural, formando parte del tejido epidermal de las plantas y que estos compuestos varían en su concentración entre las diferentes especies vegetales, aspecto que permite estimar también la composición de la dieta consumida (6,7,8).

<sup>a</sup> Recibido el 20 de enero de 1998 y aceptado para su publicación el 16 de junio de 1998.

<sup>b</sup> Semillas Berentsen S.A. de C.V. Carr. Panamericana km 285, Celaya, Gto. C.P. 38000 Apdo. Postal 4.  
e-mail: sebeinv@gtol.telmex.net.mx

## **FUNDAMENTOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE ALCANOS**

Los procedimientos analíticos para determinar alcanos en muestras vegetales y de heces se realizan por cromatografía de gases. Detalles de los procedimientos analíticos han sido presentados por Vulich *et al* (9,10). Brevemente, la técnica consiste en una saponificación directa a 90 C para transformar los ésteres que conforman los alcanos en sus correspondientes alcoholes y sales de potasio. Posteriormente, se realiza una extracción con solventes como el n-hexano o el n-heptano, para continuar con un filtrado donde se eliminan posibles contaminantes de la muestra. Finalmente, se obtiene una alícuota sobre la cual se realiza la determinación por cromatografía del o los alcanos de interés.

## **COMPOSICION DE LA DIETA A TRAVES DE ALCANOS**

Debido a que los diferentes alcanos se encuentran en distintas concentraciones en cada especie de forraje, las proporciones de cada especie dentro de la dieta se pueden estimar a través de ecuaciones simultáneas o procedimientos de cuadrados mínimos (3,11,12,13). Preparaciones de mezclas de diferentes especies de pastura, incluyendo pastos y leguminosas, han sido analizados para concentraciones de alcanos y posteriormente calculado las proporciones de cada especie dentro de la mezcla, con altos niveles de precisión (1,14).

Sin embargo, debido a que los alcanos no son totalmente recobrados en las heces (5), es necesario corregir los valores antes de

realizar estimaciones de composición de dieta (13,15). Para esto, se deben realizar estudios conducentes a la determinación exacta de la tasa de recuperación de los alcanos en estudio, o recurrir a valores de aproximación disponibles en la literatura (3).

Aunado a esto, Vulich *et al* (16) indicaron variación en la concentración de alcanos en la pastura con los días de la semana de experimentación, por lo cual sugieren la realización de muestreos de pastura diarios durante el periodo experimental. No obstante, se encontró que muestras tomadas a mano no presentaron diferencias significativas de concentraciones de alcanos con aquellas obtenidas a partir de animales fistulizados en esófago (16). Más aun, se ha sugerido mezclar las muestras de heces como alternativa para disminuir la carga de trabajo y costos implícitos en el proceso de la determinación de alcanos. El mezclar las muestras no representó mayores pérdidas en la precisión de la estimación del consumo (17).

Las proporciones de los componentes de mezclas de especies vegetales que sirvieron de alimento a borregos pudieron ser determinadas a través de la técnica de alcanos con 99 % de precisión (18). Actualmente, la técnica esta siendo empleada de manera rutinaria en la determinación de la composición de dieta de animales en pastoreo (15,18,19). Torres (19) aplicó la técnica de alcanos para estimar la composición de la dieta de vaquillas en pastoreo, dentro de un experimento sobre preferencias y selección de dieta. Los resultados fueron satisfactorios, de acuerdo con las observaciones de distribución del tiempo de pastoreo en cada especie ofrecida.

A diferencia de la estimación del consumo de alimento, la estimación de composición de dieta no requiere de la administración de alcanos externos (de cadena par); se basa exclusivamente en las concentraciones de alcanos naturales en las especies vegetales involucradas.

Por otro lado, debido a que en ocasiones las especies vegetales consumidas presentan bajos o muy similares niveles de alcanos entre ellas, las estimaciones de composición de dieta se vuelven más variables (1,14). Estos problemas parecen ser más acentuados en el caso de especies de clima tropical (20), aunque pocos estudios se han realizado con estas especies. Por esto, se ha sugerido la inclusión del mayor número de alcanos posible en el análisis, para así usar la mayor información disponible que sea posible. Esto permitiría resaltar pequeñas diferencias en concentraciones de alcanos entre las diferentes especies vegetales involucradas y así permitir la detección de pequeñas diferencias entre especies vegetales (12,13).

Otro aspecto importante es la diferencia en concentración de alcanos entre las diferentes partes de la planta (hoja y tallos), lo cual puede complicar la estimación de la composición botánica de la dieta; sin embargo, estas diferencias también pueden ser usadas en la determinación de la participación de partes de planta en la composición de la dieta consumida. Dove *et al* (21) informaron del uso de estadística multivariada para estimar no sólo la composición de una mezcla de pasturas en términos de especies vegetales sino de partes vegetales. Los resultados son promisorios; sin embargo, es necesaria la inyección de una mayor cantidad de recursos por el número total de muestras

a manejar, que se incrementa notablemente.

### **PROCEDIMIENTO PARA LA ESTIMACION DEL CONSUMO DE FORRAJE**

El consumo de forraje de animales en pastoreo ha sido calculado frecuentemente a partir de estimaciones de la producción total de heces y la digestibilidad de la dieta (Consumo = producción fecal/[1-digestibilidad]). Generalmente, estos estimados se basan en la dilución en heces de un marcador externo (comúnmente el óxido de cromo) y una determinación *in vitro* de la digestibilidad de muestras recolectadas de animales fistulizados en esófago (22). Sin embargo, uno de los primeros problemas que surgen con este tipo de procedimientos ha sido la estimación de la digestibilidad. Esta técnica del cromo/digestibilidad *in vitro*, necesariamente supone que la muestra obtenida a través de animales fistulizados en esófago es similar en composición y digestibilidad a aquella consumida por los animales a lo largo del día, cuando en realidad existen variaciones en la calidad de la dieta conforme avanza el pastoreo. Otra desventaja es que la estimación del valor de digestibilidad *in vitro* se aplica para todos los animales de la prueba, cuando en realidad existen diferencias en su capacidad para digerir el alimento consumido, debido a factores tales como el nivel de consumo, nivel de complementación alimenticia, o incluso carga parasitaria (22). El uso de alcanos para estimar el consumo no requiere de la realización de pruebas *in vitro* para estimar digestibilidad, por lo que también se puede prescindir del uso de animales fistulizados en esófago.

Los alcanos no son completamente recuperados en las heces (5,23), lo cual indica que existen pérdidas de estos compuestos a través de su paso por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la proporción de alcanos recuperados en las heces se incrementa conforme se incrementa la longitud de la cadena (7). Vulich *et al* (9) no encontraron diferencias en las tasas de recuperación de alcanos pares (C32 y C36) e impares (C29, C31, C33 y C35) en un estudio para estimar el consumo de pastura. Así, cuando se adicionan cantidades conocidas de un alcano de cadena par adyacente al tomado como referencia (marcador interno de cadena impar), el error existente en la recuperación se cancela, ya que al ser estos dos alcanos, el natural o interno (de cadena impar) y el externo (de cadena par), de similar longitud de cadena, presentan tasas similares de recuperación en heces (6,7,8). La estimación de la cantidad de material consumido se puede realizar por medio de la ecuación siguiente:

$$\text{Consumo (kgMS)} = \frac{F_i}{F_j} D_j / \left[ H_i - \frac{F_i}{F_j} H_j \right]$$

donde,

$D_j$  es la dosis diaria (mg/día) del alcano sintético (cadena par);

$H_i$  y  $F_i$  son las concentraciones de alcano natural (cadena impar; mg/kg MS) en la pastura y heces, respectivamente, y

$H_j$  y  $F_j$  son las concentraciones del alcano dosificado (cadena par) en la pastura y heces, respectivamente.

Cuando se incluyen complementos en la dieta y éstos contienen alcanos, la fórmula se ajusta para la cantidad de concentrado utilizado, de tal manera que ésta queda

como sigue:

$$\text{Consumo (kg MS)} =$$

$$\left( \frac{F_i}{F_j} (D_j + I * C_j) - I * C_i \right) / \left[ H_i - \frac{F_i}{F_j} H_j \right]$$

donde,

$D_j$  es la dosis diaria (mg/día) del alcano sintético (cadena par);

$H_i$  y  $F_i$  son las concentraciones de alcano natural (cadena impar; mg/kg MS) en la pastura y heces, respectivamente,

$H_j$  y  $F_j$  son las concentraciones del alcano dosificado (sintético; cadena par) en la pastura y heces, respectivamente;

$I$  es el consumo de concentrado (kg MS/día), y

$C_j$  y  $C_i$  son la concentración de alcanos sintético y natural, respectivamente.

Los alcanos más comúnmente utilizados en la estimación del consumo de forraje de animales en pastoreo han sido el C31, C32 y C33. Dove y Mayes (3) señalaron que al trabajar con estos alcanos se pudo estimar de manera precisa el consumo de forraje en ovinos pastoreando una pradera con predominio de ryegrass.

La recuperación de alcanos C32 y C33 en heces de vacas lecheras fue idéntico, con un valor de estimación del consumo de MS equivalente a 14.09 kg, cuando el consumo real medido fue de 14.18 kg (24).

Sin embargo, un problema encontrado con relación a la dosificación del alcano sintético ha sido la necesidad de su dosificación diaria, lo cual puede traer variaciones en su concentración fecal a lo largo del día, para lo cual se ha sugerido la dosificación diaria en dos partes (mañana y tarde) (24).

Otro aspecto de importancia es la concentración natural del alcano tomado como marcador interno. Laredo *et al* (20) recomendaron una concentración de alcanos superior a 50 mg/kg de MS para poder realizar estimaciones de manera más precisa.

Una recomendación práctica en este sentido es que al trabajar con especies de las cuales no se tiene antecedente de concentración de alcanos, se determinen varios, normalmente los impares C29, C31, y C33. El alcano a usar en la estimación del consumo sería aquél de mayor concentración o, en el caso de tener concentraciones similares, aquél de cadena más larga.

Al igual que en el caso de la estimación de la composición de la dieta de animales en pastoreo, la técnica de alcanos también está siendo adoptada de manera rutinaria en experimentos para la estimación del consumo de pastura (15,25,26, 27).

Dove *et al* (8) condujeron un experimento en el cual el consumo de forraje de borregas lactantes fue estimado mediante la aplicación de una técnica *in vitro* y la de alcanos. Los autores concluyeron que la técnica de alcanos es más exacta que la técnica *in vitro* para estimar consumo de forraje. Piasentier *et al* (28) compararon la técnica de alcanos con la técnica del cromo para estimación de consumo de forraje, concluyendo que la primera presenta ventajas de consideración práctica sobre la segunda. Esta técnica de alcanos fue comparada bajo condiciones de pastoreo por Reeves *et al* (29). Sus conclusiones concuerdan con las obtenidas en otros trabajos, demostrando en términos generales, la utilidad de la técnica.

## USO DE EQUIPO DE LENTA LIBERACION

Tal vez el mayor problema en la aplicación de la técnica de alcanos para la estimación del consumo sea la necesidad de una dosificación diaria de alcanos sintéticos. Esto es aún más crítico en el caso de experimentos que involucran comportamiento animal, ya que esto se vuelve un factor que altera el comportamiento normal del animal (3). En la actualidad, se dispone de equipo diseñado para suministrar dosis continuas de producto por varios días, para lo cual sólo se requiere de manejar al animal una sola ocasión, al momento de la aplicación de tal equipo. Este equipo ha sido utilizado para la dosificación de varios compuestos y, recientemente se han incluido los alcanos, de tal manera que los animales sólo son manejados el día en que el equipo, en forma de cápsulas de lenta liberación, se inserta en el rumen (4,30).

Estas cápsulas de lenta liberación han sido estudiadas por varios autores. Ellis *et al* (31) y Buntinx *et al* (32) estimaron producción fecal usando cromo como marcador externo. No se encontraron resultados adecuados al usar cápsulas de lenta liberación, relacionando la falta de precisión a una liberación variable del marcador. En contraste, Dove *et al* (33) indicaron que los niveles de alcanos derivados de una cápsula de lenta liberación se estabilizaron en las heces de ovinos después del día cinco de administración de las cápsulas. Dos Santos y Petit (34) evaluaron una cápsula de lenta liberación de cromo como marcador externo y la técnica de cenizas ácido-insolubles en la estimación de producción fecal. Sus hallazgos indican que las

cápsulas de lenta liberación fueron más confiables que las cenizas ácido-insolubles. Estos trabajos sugieren que el mejoramiento de las cápsulas de lenta liberación permiten, hoy en día, realizar estimaciones de consumo de forraje más confiables; sin embargo, es necesaria más investigación con relación a las tasas de liberación de estas cápsulas, para disminuir las variaciones que se presentan.

## DISCUSION

La técnica de alcanos permite realizar estimaciones de consumo de alimento de animales en pastoreo con alto grado de aproximación, aunque no es completamente exacta. Sin embargo, la técnica de alcanos presenta ventajas que facilitan su aplicación y compensan las desventajas de la misma. Por ejemplo, la técnica de alcanos tiene la ventaja de incluir menos trabajo analítico y de no ser influida por factores que afectan la digestibilidad, tales como la complementación alimenticia con concentrados, debido a que se toma en cuenta un valor de digestibilidad individual, a diferencia de la técnica del cromo, donde se toman valores de digestibilidad *in vitro* como referencia para el grupo de animales en estudio. Esto hace que la técnica de alcanos sea de fácil aplicación bajo condiciones de pastoreo.

El uso de esta técnica permite obtener estimaciones tanto del consumo de forraje como de la composición de la dieta de animales en pastoreo. Además, se permite la realización de estas estimaciones sin disturbios en el comportamiento animal, ya que una vez insertadas las cápsulas de lenta liberación en el rumen, no se requiere del manejo de los animales. Especial cuidado debe ser ejercido en el

muestreo de la pradera en estudio, así como de las heces.

Por otro lado, la mayoría de los trabajos presentados sobre el uso de alcanos han sido realizados con ovinos (3, 5, 6, 7, 8, 9, 18) y solo recientemente se ha extendido el uso de esta técnica a bovinos (19, 27, 26, 29). La técnica parece ser ampliamente aceptada en los primeros; sin embargo, se requieren mayores estudios, particularmente en el caso de los bovinos, principalmente con respecto a la estimación del consumo voluntario por una presumible mayor tasa de retención de alcanos de cadena impar (internos) comparado con aquéllos de cadena par (externos), lo que puede conducir a valores subestimados de consumo (27).

A pesar de ser solamente aplicada a un número limitado de especies animales, la técnica es factible de ser utilizada en otras especies incluyendo cabras, ciervos y otros herbívoros incluso no rumiantes (4), aunque deben conducirse estudios preliminares para corroborar su funcionalidad antes de aplicarla directamente para la estimación de la composición de dieta y/o consumo de alimento.

Asimismo, la mayoría de los trabajos han incluido principalmente especies de clima templado, principalmente ryegrass, falaris, trébol blanco y trébol subterráneo (6, 7, 9, 16, 17, 21) en praderas homogéneas, con pocos o nulos intentos en pastos tropicales (20) o especies de agostaderos. En la medida en que esta técnica se incluya en ambientes diferentes donde otras especies vegetales a las citadas se desarrollan, así como a otras especies animales, mayor número de especies vegetales serán analizadas para presencia y concentración de alcanos, lo cual

incrementará las herramientas para la estimación tanto de la composición dietaria como del consumo de animales en pastoreo.

## THE ALKANES AND THE ESTIMATION OF HERBAGE INTAKE AND BOTANICAL COMPOSITION OF THE DIET OF GRAZING ANIMALS

### SUMMARY

Torres R A. *Téc. Pec. Méx.* Vol 36 No 2 1998. pp. 151-158. Botanical composition of the diet and forage intake of grazing animals are of common interest among scientists and people involved in animal production matters. However, due to a lack of reliable techniques, these parameters are difficult to estimate. N-alkanes, plant cuticular waxes, are a new alternative for to the determination of both botanical composition and herbage intake of grazing animals. These compounds are present in different concentrations among plant species, which influences the pattern of n-alkanes present in faeces, thus allowing the estimation of the botanical composition of the consumed diet through simultaneous equations or least squares procedures. When a synthetic alkane is administered to the experimental animals, as external marker, allows for herbage intake estimations. Aspects related to the methodology as well as advances in new technology to apply this technique are discussed. The alkane technique offers advantages in the estimation of both botanical composition of the diet and herbage intake of grazing animals due to its ease of application and reliability.

**KEY WORDS:** Alkanes, Feed intake, Botanical composition of the diet, Herbivores.

### REFERENCIAS

- Dove H. Advances in the estimation of intake and diet selection in the grazing animal. En: Farrel D J. (editor) *Recent advances in animal nutrition in Australia.* Australia. 1993: 34-44.
- Dove H. Constraints to the modelling of diet selection and intake in the grazing ruminant. *Aust. J. Agric. Res.* 1996; 47: 257.
- Dove H, Mayes R W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 1991; 42: 913.
- Taylor R. Plants have fingerprints too. *Rural Res.* 1994/95; 165: 10.
- Mayes R W, Lambs C S, Colgrove Patricia M. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci., Camb.* 1986; 107: 161.
- Dove H, Foot J Z, Freer M. Estimation of pasture intake in grazing ewes, using the alkanes of plant cuticular waxes. *Proc. XVI Int. Grasslnd. Congr. Nice, France.* 1989: 1091-1092.
- Dove H, Mayes R W, Freer M, Coombe J B, Foot J Z. Faecal recoveries of the alkanes of plant cuticular waxes in penned and in grazing sheep. *Proc. XVI Int. Grasslnd. Congr. Nice, France.* 1989: 1093-1094.
- Dove H, Milne J A, Mayes R W. Comparison of herbage intakes estimated from *in vitro* or alkane-based digestibilities. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 1990; 50: 457-459.
- Vulich S A, O'Riordan E G, Hanrahan J P. Use of n-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: accuracy and precision of the estimates. *J. Agric. Sci., Camb.* 1991; 116: 319.
- Vulich S A, Hanrahan J P, Crowley B A. Modification of the analytical procedures for the determination of herbage and faecal n-alkanes used in the estimation of herbage intake. *J. Agric. Sci., Camb.* 1995; 124: 71.
- Dove H, Mayes R W. Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J. Nutr.* 1996; 126: 13.
- Dove H, Moore A D. Using a least-squares optimization procedure to estimate botanical composition based on the alkanes of plant cuticular wax. *Aust. J. Agric. Res.* 1995; 46: 1535.
- Newman J A, Thompson W A, Penning P D, Mayes R W. Least-squares estimation of diet composition from n-alkanes in herbage and faeces using matrix mathematics. *Aust. J. Agric. Res.* 1995; 46: 793.
- Dove H. Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures. *Aust. J. Agr. Res.* 1992; 43: 1711.
- Dove H. Plant cuticular wax alkanes- A new technique for estimating diet selection and intake in the grazing animal. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 1994; 20: 55.

16. Vulich S A, Hanrahan J P, O'Riordan E G. Pasture sampling for the estimation of herbage intake using n-alkanes: Evaluation of alternative sampling procedures. *Irish J. Agric. Food Res.* 1993; 32: 1.
17. Vulich S A, Hanrahan J P. Faecal sampling for the estimation of herbage intake using n-alkanes: evaluation of sample pooling and the use of rectal grab samples. *J. Agric. Sci., Camb.* 1995; 124: 79-86.
18. Wen Ch, Lefroy R, White Anne, Scott J. Using the alkane technique to quantify sheep selectivity when grazing perennial and annual pastures. Proceedings of the 10th annual conference of the grassland society of New South Wales. Armidale, Australia. 1995: 109.
19. Torres R A. The effect of herbage availability and species choice on grazing preference of dairy cattle. Masters degree thesis. Massey University. New Zealand. 1997: 131.
20. Laredo M A, Simpson G D, Minson D J, Orpin C G. The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter by grazing ruminants. *J. Agric. Sci. Camb.* 1991; 117: 355-361.
21. Dove H, Mayes R W, Freer M. Effects of species, plant part, and plant age on the n-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. *Aust. J. Agric. Res.* 1996; 47: 1333.
22. Burns J C, Pond K R, Fisher D S. Measurement of forage intake. En: Fahey G C Jr. (ed.) Forage quality, evaluation and utilization. Wisconsin, USA 1994: 494-532.
23. Casson T, Rowe J B, Thorn C W, Harris D. The use of natural n-alkanes in medic and clover as indigestible markers. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 1990; 18: 462.
24. Dillon P, Stakelum G. Herbage and dosed alkanes as a grass measurement technique for dairy cows. *Irish J. Agric. Res.* 1989; 28: 104.
25. Friend M A, Robards G E, Lindsay A R, Champion S C. The relative intake of three Merino strains under different grazing regimes estimated using alkane technology. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 1995; 55: 127.
26. Mackle T R, Parr C R, Stakelum G K, Bryant A M, MacMillan K L. Feed conversion efficiency, daily pasture intake, and milk production of primiparous Friesian and Jersey cows calved at two different liveweights. *N.Z. J. Agric. Res.* 1996; 39: 357.
27. Oliván M, Osoro K. The use of n-alkanes for estimating feed intake in beef cows. *Ann. Zootech.* 1995; 44: 239.
28. Piasentier E, Bovolenta S, Malossini F, Susmel P. Comparisons of n-alkanes or chromium oxide methods for estimation of herbage intake by sheep. *Small Rum. Res.* 1995; 18: 27.
29. Reeves M, Fulkerson W J, Kellaway R C, Dove H. A comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) pasture. *Aust. J. Exper. Agric.* 1996; 36: 23.
30. Ralph W. Controlled-release technology proves its worth. *Rural Res.* 1992; 154: 10.
31. Ellis K J, Laby R H, Costigan P, Zirkler K, Choice P G. Continuous administration of chromic oxide to grazing cattle. *Proc. Nutr. Soc.* 1982; 7: 177.
32. Buntinx S E, Pond K R, Fisher D S, Burns J C. Evaluation of the Captec chrome controlled-release device for the estimation of fecal output by grazing sheep. *J. Anim. Sci.* 1992; 70: 2243.
33. Dove H, Mayes R W, Lamb C S, Ellis K J. Evaluation of an intra-ruminal controlled-release device for estimating herbage intake using synthetic and plant cuticular wax alkanes. Proceedings of the third international symposium of nutrition of herbivores. Malaysia. 1994: 82.
34. Dos Santos G T, Petit H V. Prediction of fecal output in sheep fed silage using the Captec chrome controlled-release capsule. *Small Rum. Res.* 1996; 20: 223.