

Efecto del ensilaje y el heno de *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* sobre la producción de gas *in vitro*

L. Bernal¹, P. Ávila^{2,3}, G. Ramírez^{2,4}, C. E. Lascano^{2,5}, T. Tiemann⁶ y H. Hess⁷

Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Zoot.
Est. Maestría Ciencias Agrarias Producción Animal Tropical
Recibido Diciembre 20, 2007. Aceptado Febrero 15, 2008

Effect of *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* and *Vigna unguiculata* silage and hay on *in vitro* gas production

ABSTRACT. The volume of gas produced when silage and hay of tanniniferous legumes were fermented was evaluated. There were 28 treatments (14 each of silages and hays, half with and half without polyethylene glycol (PEG) to inactivate the tannins) three replicates per treatment. The seven types of forage were: tanniniferous, *Calliandra calothyrsus* (CC) 100% and *Flemingia macrophylla* (FM) 100%, non-tanniniferous *Vigna unguiculata* (VU) 100% and *Cratylia argentea* (CA) 100%; and the mixtures CC 67%/VU 33%, FM 67%/VU 33%, and CA 67%/VU 33%. The Gas Trasduder Technique (GTT) of Theodorou and William was used to determine the *in vitro* fermentation rate and magnitude. Gas production data obtained during 144 h of incubation were fitted to the Gompertz model. The silages showed a greater rate of gas production (GPR) than the hays ($P < 0.05$), but the latter were higher in dry matter degradability (DMD) and crude protein degradability (CPD) and ammonia liberation (NH_3). The addition of PEG had little overall effect on GPR (but was effective with CC) or DMD, however it increased CPD and NH_3 ($P < 0.05$). As to the effect of forage type, VU excelled in GPR followed by CA/VU and FM/VU; VU was also highest in DMD followed by CA/VU; while CA, CA/VU and VU were highest in CPD; CC and FM were decidedly inferior in GPR and *in vitro* degradability.

Key words: *Calliandra calothyrsus*, *Cratylia argentea*, *Flemingia macrophylla*, Gas Trasduder Technique (GTT), Tannins, *Vigna unguiculata*.

RESUMEN. Se evaluó el volumen de gas producido cuando se fermentaron ensilajes y henos de leguminosas taníferas. Se emplearon 28 tratamientos (14 de ensilajes y 14 de henos, la mitad con y la otra mitad sin adición de polietileno glicol (PEG) para inactivar los taninos) y tres repeticiones por tratamiento. Los siete tipos de leguminosas fueron: taníferas, *Calliandra calothyrsus* (CC) 100% y *Flemingia macrophylla* (FM) 100%; no taníferas, *Vigna unguiculata* (VU) 100% y *Cratylia argentea* (CA) 100%; y las combinaciones CC 67%/VU 33%, FM 67%/VU 33% y CA 67%/VU 33%. La técnica de producción de gas de Theodorou y William fue utilizada para determinar la tasa de fermentación *in vitro* y su magnitud. Los datos de producción de gas obtenidos durante 144 h de incubación se ajustaron

¹Autor para la correspondencia, e-mail: lcbernalb@palmira.unal.edu.co

¹Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Zoot. Est. Maestría Ciencias Agrarias Producción Animal Tropical.

²Programa Leguminosas y Forrajes Tropicales. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. Cali, Colombia.

³Jefe de Laboratorio de Calidad de Forrajes. CIAT. Email: p.avila@cgiar.org

⁴Estadista. CIAT Email: g.ramirez@cgiar.org ⁵Líder Programa de Leguminosas y Forrajes Tropicales. CIAT. Email: c.lascano@cgiar.org

⁵Líder Programa de Leguminosas y Forrajes Tropicales. CIAT.

⁶Candidato a PhD. ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092. Zurich, Suiza.

⁷Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y productos Lácteos, CH-1725. Posieux, Suiza.

al modelo matemático de Gompertz. Los ensilajes presentaron mayor tasa de producción de gas (TPG) que los henos ($P < 0.05$), pero éstos fueron de más alta degradabilidad de materia seca (DMS) y de proteína cruda (DPC) y de mayor liberación de amonio (NH_3). La adición de PEG tuvo poco efecto global sobre la TPG (aunque resultó efectiva con CC) y sobre la DMS, sin embargo, promovió mayor DPC y NH_3 ($P < 0.05$). Referente al tipo de leguminosa, VU fue superior en TPG seguido por CA/VU y FM/VU; VU fue la más alta también en DMS seguida por CA/VU; mientras CA, CA/VU y VU fueron las más altas en DPC; las taníferas CC y FM se mostraron marcadamente inferiores en TPG y degradabilidad *in vitro*.

Palabras clave: *Calliandra calothyrsus*, *Cratylia argentea*, *Flemingia macrophylla*, Taninos, Técnica de producción de gas, *Vigna unguiculata*.

Introducción

La producción animal en la zona tropical colombiana ha tenido que enfrentar los problemas de baja disponibilidad de forraje y pobre calidad nutritiva de las pasturas que son la base de alimentación del sistema ganadero. No obstante, Colombia se caracteriza por tener una gran biodiversidad vegetal que se ofrece como una potencialidad para la disposición de forraje, en variedad y calidad útil en la alimentación animal, y necesario para suplir sus necesidades alimenticias que proveerán la proteína de origen animal indispensable en el consumo humano. Asimismo, se deben generar mezclas entre leguminosas que por sus potencialidades ofrezcan de manera combinada el aprovechamiento de las calidades y limitaciones nutricionales (compuestos antinutricionales

como taninos) de una u otra. Se planteó como alternativa de alimentación en la época seca, la de aprovechar la sobreoferta forrajera que se presenta en la época lluviosa para conservarla en forma de heno y ensilaje y determinar mediante evaluaciones cuál sería su potencial de utilización a nivel de la flora bacteriana en un sistema de fermentación cerrado. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el efecto de las mezclas de leguminosas con taninos *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla* y sin taninos *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* henificadas y ensiladas sobre la tasa de producción de gas, la degradación de materia seca (MS) y proteína cruda (PC), mediante la técnica de producción de gas ("Gas Pressure Transducer Technique" - GTT).

Materiales y Métodos

En esta prueba se seleccionaron como especies forrajes con presencia de taninos *Calliandra calothyrsus* (CIAT 22310) y *Flemingia macrophylla* (CIAT 17403), y sin taninos Caupi (*Vigna unguiculata* CIAT 1088/4, 288, 391, 9611 Y 715) y *Cratylia argentea* (CIAT 18516-18668) cosechadas en la Estación Experimental Santander de Quilichao (CIAT). Se emplearon 28 tratamientos (14 con ensilajes y 14 con henos), con tres repeticiones por tratamiento. A los tratamientos del 15 al 28, se les adicionó polietileno glicol (PEG) para inactivar los taninos.

Los tipos de forraje fueron: 1. Ensilaje *Calliandra calothyrsus* 100%; 2. Ensilaje *Flemingia macrophylla* 100%; 3. Ensilaje *Vigna unguiculata*, 100%; 4. Ensilaje *Cratylia argentea* 100%; 5. Ensilaje *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%; 6. Ensilaje *Flemingia macrophylla/Vigna*

unguiculata 33/67%; 7. Ensilaje *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%; 8. Heno *Calliandra calothyrsus* 100%; 9. Heno *Flemingia macrophylla*, 100%; 10. Heno *Vigna unguiculata* 100%; 11. Heno *Cratylia argentea* 100%; 12. Heno *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%; 13. Heno *Flemingia macrophylla/Vigna unguiculata* 33/67% y 14. Heno *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%.

Se utilizó el método de producción de gas propuesto por Theodorou y William (1994) que consiste en fermentar 1 g de sustrato durante 144 h en botellas de 125 ml, a las cuales se les adicionó 10 ml de líquido ruminal, 85 ml de buffer y 4 ml de solución reductora. La producción de gas en términos de presión y volumen se determinó con un medidor de presión y una jeringa a diferentes intervalos de la

fermentación 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 h.

Se determinó la composición bromatológica para MS, materia orgánica (MO), proteína cruda (PC) y fibras. Se cuantificó la cantidad de amonio por el Método del Indofenol de McCullough (1982) y taninos condensados para *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla* por el método de butano-HCL de Mueller-Harvey y McAllan (1992). La degradación de proteína y materia seca se determinó por diferencia de peso de las muestras al inicio y al final (Tilley y Terry, 1963).

Con el fin de estudiar los efectos de tipo de forraje (ensilaje y heno de las leguminosas y sus combinaciones) y la adición o no de PEG, los datos de producción de gas obtenidos para cada tratamiento después del periodo de incubación de 144 h fueron ajustados al modelo matemático de regresión exponencial propuesto por Gompertz de la forma:

$$y = a * e^{-b * e^{-cx}}$$

Donde:

y: volumen (ml)

x: tiempo (h)

a: asíntota (valor al cual tiende el volumen cuando x es muy grande)

b: punto de inicio (corte con eje y)

c: tasa del crecimiento (ml/h)

Para estimar estos parámetros del modelo (a, b y c) se hizo un análisis de regresión no lineal (Nlin) seguido de un análisis general multivariado para los parámetros del modelo (MANOVA), con el cual se pudo notar las diferencias globales entre las curvas para las diferentes fuentes de variación. Las variables PC degradada (%), MS degradada (%) y amonio (mmol) se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) en el programa SAS, versión 9.1 de 2003.

Resultados y Discusión

Efecto del forraje y la calidad nutricional

En el Cuadro 1 se presenta la composición bromatológica de las dietas. El nivel de CP de los forrajes ensilados tendió a ser menor que en los henificados, particularmente en el caso de *Vigna unguiculata* y sus mezclas con leguminosas taníferas. El nivel de fibra detergente neutro (FDN) fue notablemente alto en ensilajes de *Flemingia macrophylla* y *Cratylia argente* y en heno de esta última, mientras el de fibra detergente ácido (FDA) fue mayor en *F. macrophylla* tanto entre los ensilajes como entre los henos.

En el Cuadro 2 aparecen los efectos por procesamiento, adición de PEG y forraje incubado sobre los parámetros de Gompertz en la producción de gas. Se puede observar que los ensilajes tuvieron mayor tasa de crecimiento del gas que los henos ($P < 0.05$) y que la adición de polietileno glicol (PEG) no tuvo efecto. Por otra parte, hubo un efecto altamente significativo sobre la producción de gas debido al tipo de forraje incubado. La mayor tasa de producción de gas fue para *Vigna* y las menores para las leguminosas taníferas *Calliandra* y *Flemingia*.

Los perfiles de acumulación de la producción de gas presentaron diferencia por el tipo de forraje incubado, su calidad nutricional y nivel de inclusión. El mayor perfil de producción de gas

fue para los ensilajes y para las leguminosas sin taninos como *Vigna* (Figura 1).

Se encontró interacción entre el procesamiento y el forraje sobre la tasa de producción de gas, así los ensilajes produjeron mayor gas, aunque *Flemingia* 33%, produjo más gas henificado. Asimismo, se encontró interacción entre nivel de inclusión del forraje en las mezclas y la adición de PEG sobre la producción del gas. *Calliandra* y *Flemingia* mostraron que la adición de PEG aumentó su producción de gas, logrando inactivar los taninos.

Las degradaciones de las fracciones MS, PC y la concentración de amonio para los forrajes incubados aparecen en el Cuadro 3. La degradación de MS fue mayor para los henos que para los ensilajes ($P < 0.05$). Hubo efecto por el tipo de forraje incubado, *Vigna* y sus mezclas presentaron degradaciones de MS y proteína superiores que las leguminosas taníferas *Calliandra* y *Flemingia*. La adición de PEG tuvo efecto significativo sobre la degradación de la proteína. Como consecuencia de esta degradación, la concentración de amonio fue mayor para henos que para ensilajes ($P < 0.05$) y la adición de PEG también tuvo efecto significativo.

La concentración de amonio fue mayor en las especies no taníferas como *Vigna* y *Cratylia* y en sus combinaciones. La *Calliandra* 100% presenta la más baja concentración de amonio.

Cuadro 1. Composición bromatológica de los forrajes empleados (valores expresados como porcentaje de la materia seca)

Tratamientos	MS%	PC %	FDN %	FDA %	TC Total (%)*
<u>Ensilajes</u>					
<i>Calliandra calothyrsus</i> 100%	94.41	14.15	59.44	46.13	2.95
<i>Flemingia macrophylla</i> 100%	95.24	16.17	66.65	57.18	2.57
<i>Vigna unguiculata</i> 100%	84.27	13.26	39.50	30.56	-
<i>Cratylia argentea</i> 100%	88.61	13.84	59.14	41.35	-
<i>Calliandra calothyrsus</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	90.69	13.03	44,25	42.63	0.97
<i>Flemingia macrophylla</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	91.06	13.36	48,46	39,34	0.84
<i>Cratylia argentea</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	87.54	14.72	45,98	34,12	-
<u>Henos</u>					
<i>Calliandra calothyrsus</i> 100%	91.78	16.08	52.49	46.08	23.00
<i>Flemingia macrophylla</i> 100%	89.91	17.96	61.44	53.18	3.66
<i>Vigna unguiculata</i> 100%	90.62	18.96	58.08	31.33	-
<i>Cratylia argentea</i> 100%	90.83	16.60	75.11	46.42	-
<i>Calliandra calothyrsus</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	91.00	18.01	56.24	36.20	7.59
<i>Flemingia macrophylla</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	90.38	18.63	62.49	38.54	1.20
<i>Cratylia argentea</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	90.68	18.18	63.70	36.31	-

* Taninos Condensados totales: comprende la cuantificación de los condensados solubles e insolubles.

La mayor producción de gas, degradabilidad de MS y PC y concentración de amonio fue para *Vigna* y *Cratylia*, lo que se puede atribuir a la ausencia de taninos condensados, que hace más disponible los nutrientes para la fermentación microbiana, si bien *Cratylia* también mostró altos valores de FDN coincidiendo con lo informado por Abreu *et al.*, (2003) y Valencia (2003). Los

más bajos registros se reportaron para las especies taníferas *Calliandra* y *Flemingia*, lo cual coincide con lo observado por Sanabria *et al.* (2006).

El valor de MS degradada de *Cratylia* fue similar al obtenido por Narváez (2000), siendo en ambos casos superiores a los informados por Dzwolla *et al.* (1995), aunque con *Calliandra* y

Cuadro 2. Efecto de forma de conservación del forraje y de adición de PEG sobre la tasa de producción de gas de leguminosas con y sin taninos

Tratamientos	Parámetros de Gompertz		
	a (ml) asíntota	b (ml) punto inicial	c (ml/h) tasa de crecimiento
<u>Efecto procesamiento*</u>			
Henos	159 ^a	2.48 ^a	0.061 ^b
Ensilajes	144 ^b	2.22 ^b	0.069 ^a
<u>Efecto PEG*</u>			
Con PEG	155 ^a	2.39 ^a	0.065 ^a
Sin PEG	148 ^a	2.31 ^a	0.064 ^a
<u>Efecto forrajes*</u>			
<i>V. unguiculata</i> 100%	214 ^a	2.63 ^a	0.087 ^a
<i>Cratylia argentea</i> / <i>V. unguiculata</i> 33/67%	188 ^b	2.53 ^{ab}	0.075 ^b
<i>Calliandra</i> / <i>V. unguiculata</i> 33/67%	172 ^c	2.37 ^{bc}	0.068 ^c
<i>Cratylia</i> 100%	159 ^d	2.24 ^{cd}	0.062 ^d
<i>Flemingia macrophylla</i> / <i>V. unguiculata</i> 33/67%	156 ^d	2.39 ^{bc}	0.074 ^b
<i>Calliandra</i> 100%	93 ^e	2.16 ^d	0.040 ^f
<i>Flemingia macrophylla</i> 100%	80 ^f	2.13 ^d	0.048 ^e

* Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa.

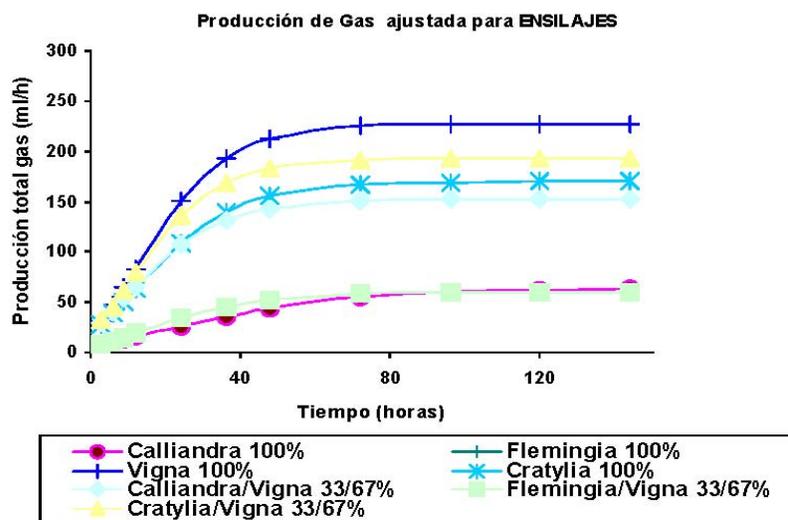


Figura 1. Perfil de la producción de Gas acumulada de los forrajes ensilados.

Flemingia obtuvieron valores más altos a los encontrados en el presente ensayo. Por otra parte, la baja producción de gas y degradación de MS y PC de *Calliandra* y *Flemingia* puede estar relacionado con sus contenidos módicos de proteína cercanos al 16%, alta proporción de fibra y la presencia de taninos condensados en sus estructuras que, dada su potencialidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y saponinas, entre otros (Mueller Harvey, 1989; Mueller-Harvey y McAllan, 1992; Fajardo, 1998), pueden ligar componentes de la pared celular y hacen en

gran parte indisponible los nutrientes para los microorganismos.

La inclusión de *Calliandra* y *Flemingia* en niveles altos disminuyó la degradación de MS y PC. Sin embargo, las combinaciones de estas dos taníneras con *Vigna* permiten recomendar su inclusión en el nivel del 33% en las dietas sin tener efectos negativos. Estos resultados coinciden con los de Hess *et al.* (2004) y Sturm *et al.* (2006).

Efecto de la adición de PEG

La adición de PEG mostró mayor ($P < 0.05$) degradación de PC y leve aumento de la

Cuadro 3. Degradación de MS (%), proteína (%) amonio (mmol) con y sin PEG en henos y ensilajes.

Tratamientos	MS degradada (%)	PC degradada (%)	NH3 (mmol)
<u>Efecto procesamiento</u>			
Henos	49.25 ^a	52.0 ^a	15.8 ^a
Ensilajes	44.82 ^b	36.4 ^b	13.8 ^b
<u>Efecto PEG</u>			
Con PEG	47.28 ^a	50.1 ^a	15.7 ^a
Sin PEG	46.80 ^a	38.2 ^b	14.0 ^b
<u>Efecto forraje</u>			
<i>Cratylia</i> 100%	51.2 ^c	64.1 ^a	15.4 ^b
<i>Vigna</i> 100%	68.5 ^a	57.5 ^a	16.6 ^a
<i>Calliandra</i> 100%	25.6 ^e	18.7 ^d	11.5 ^d
<i>Flemingia</i> 100%	25.0 ^e	25.8 ^d	14 ^c
<i>Flemingia/Vigna</i> (33/67%)	47.5 ^d	35.6 ^c	15 ^b ^c
<i>Calliandra/Vigna</i> (33/67%)	50.8 ^c	46.6 ^b	14 ^c
<i>Cratylia/Vigna</i> (33/67%)	60.5 ^b	60.9 ^a	17 ^a

* Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

degradación de MS en comparación con los resultados de Carulla (1994), Barahona *et al.* (1997), Martin *et al.* (2004), Canbolat *et al.* (2005) y Makkar *et al.* (1995). Los forrajes que tienen altos contenidos de taninos en sus hojas no siempre responden de forma similar a la suplementación de PEG. Por ejemplo en este ensayo la producción de gas se incrementó en mayor proporción para *Calliandra* + PEG (28%) que para *Flemingia* (20%) y su mezcla (2.4%). Posiblemente esta diferencia es debida a la composición química y la estructura de los taninos de cada especie. Lo anterior concuerda con observaciones por Getachew *et al.* (2004). La tasa de producción de gas (c) encontrada en este estudio para *Calliandra* con y sin PEG coincide de manera muy similar con la obtenida por Sturm *et al.* (2006) y Hess *et al.* (2006) a las 144 h de incubación, pero no así para *Vigna* y *Flemingia* cuyos valores en este estudio fueron mayores.

Amonio

La concentración de amonio puede estar influenciada por la tasa de degradación de los carbohidratos, además de los componentes nitrogenados. Al aumentar la degradación de carbohidratos la concentración de amonio se verá afectada por que promueve el crecimiento microbial que se refleja en pérdidas de nitrógeno amoniacal (Getachew *et al.*, 2000). De hecho la presencia en los forrajes de taninos afectó la concentración de amonio en este ensayo,

encontrándose valores más bajos para *Calliandra* y *Flemingia* que para las leguminosas sin taninos. Esto coincide con lo reportado para *Calliandra* y *Cratylia* en el estudio de Hess *et al.* (2006).

Efectos del procesamiento.

El proceso de ensilaje disminuyó el contenido de PC y degradabilidad de la MO y produjo un aumento de FDN y FDA. La dinámica de la fermentación muestra una clara diferencia entre henos y ensilajes para alcanzar la curva. Esto se debe a que los ensilajes han experimentado un proceso de fermentación previo que ha favorecido la degradación de nutrientes, dejando disponible la materia orgánica para la actividad microbial que liberó mayor cantidad de gas. Los contenidos de taninos de las leguminosas *Calliandra* y *Flemingia* hacen que las producciones de gas sean bajas, con un coeficiente de correlación de 0.96, igual de alto como los obtenidos por Barahona (1999) y Giner-Chavez (1996); a mayor contenido de taninos menor producción de gas (Sanabria *et al.*, 2006). La producción de gas estuvo relacionada con la degradación de MS, con un $r^2 = 0.96$ para los ensilajes y de $r^2 = 0.91$ para los henos, y con la degradación de proteína, con $r^2 = 0.62$ para ensilajes y $r^2 = 0.73$ para los henos. Esto puede explicarse por los complejos que se forman entre los taninos y las proteínas u otras moléculas presentes.

Conclusión

La evaluación de leguminosas con la Técnica de Producción de Gas - (GTT) evidenció un efecto marcado por el tipo de forraje que fue incubado, así las leguminosas sin taninos *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea* presentaron los valores más altos de producción de gas y degradación de materia seca y proteína cruda al igual que la concentración de amonio. Los ensilajes presentaron mayor tasa de producción

de gas, pero los henos mayor degradación de nutrientes. Las leguminosas taníferas *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla* se degradaron menos cuando sus niveles de inclusión fueron altos, pero los efectos sobre la producción de gas y la tasa de degradación de MS y proteínas, disminuyeron al incluirse en las mezclas de leguminosas con y sin taninos.

Literatura Citada

- Abreu, A., J. E. Carulla, M. Kreuzer, C. E. Lascano, T. Diaz, A. Cano y H. D. Hess. 2003. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de *saponinas* de *sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema rusitec. Rev. Colombiana Cienc. Pec. 16: 147-154.
- Barahona, R. 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the stand point of structure-activity relationships. PhD Thesis. The University of Reading. 312 p.
- Barahona, R., C. E. Lascano, R. Cochran, J. Morrill, and E. C. Titgemeyer. 1997. Intake, digestion,

- and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. *J. Anim. Sci.* 75: 1633-1640.
- Canbolat, O., A. Kamalk, E. Ozkose, C. O. Ozkan, M. Sahin, and P. Karabay. 2005. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of *Quercus cerris* leaves. *Livestock Research for Rural Development* 17(4).
- Carulla, J. E. 1994. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tannins. PhD dissertation. University of Nebraska. Lincoln. 126 p.
- Dzowella, B., L. Hove, and J. Topps. 1995. Nutritional and antinutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen from some tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 207-214.
- Fajardo, C. H. 1998. Estudio de la interacción *in vitro* entre proteínas de origen vegetal y taninos. Trabajo de grado de Químico. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. 76 p.
- Getachew, G., E. Depeters and P. Robinson. 2004. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *California Agriculture.* 58:54-58.
- Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2000. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Br. J. Nutr.* 84:77-83.
- Giner-Chavez, B. I. 1996. Condensed tannins in tropical forages. Ph. D. Dissertation. Cornell University. Ithaca, NY.
- Hess, H. D., T. T. Tiemann, F. Noto, S. Franzel, C. E. Lascano, and M. Kreuzer. 2006. The effects of cultivation site on forage quality of *Calliandra calothyrsus* var. Patulul. *Agroforest Syst.* April 2006.
- Hess, H. D., F. L. Valencia, L. M. Monsalve, C. E. Lascano, and M. Kreuzer. 2004. Effects of tannins in *Calliandra calothyrsus* and supplemental molasses on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.*, 13(Supl. 1): 95-98.
- Makkar H. P. S., M. Blummel, and K. Becker. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrrolidones or polyethylene glycols and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *Br. J. Nutr.* 73:897-913.
- Martin, I., D. Yañez, A. Mohumen, and E. Molina. 2004. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal supply on two-stage olive cake fermentation. *Animal Research* 53:245-257.
- Mueller-Harvey, I. and A. B. McAllan. 1992. Tannins and their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotech.* 1:151-217.
- Mueller-Harvey, I. 1989. Identification and importance of polyphenolic compounds in crop residues. In: Chesso, A., Ørskov, E. R. (Eds). *Physio-chemical characterization of plant residues for industrial and feed use.* Elsevier Sci. Pub. Co., Inc. New York. pp. 88-109.
- Narváez, N. 2000. Caracterización nutritiva de especies arbóreas con potencial forrajero en Colombia. Tesis de Magister. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 150 p.
- Sanabria, C. P., R., Barahona, T. T. Tiemann, C. E., Lascano, E. Martin y F. Rodriguez. 2006. Efecto de la inclusión de forraje de *Vigna unguiculata*, *Flemingia macrophylla* y *Calliandra calothyrsus* a una dieta basal de *Brachiaria humidicola* sobre los principales grupos de microorganismos ruminales y parámetros de fermentación *in vitro*. En: Segundo Taller de taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Bogotá. pp. 30-34.
- SAS. 2003. SAS/STAT software. Release 9.1 SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Stúrm, C. D., T. T. Tiemann, C. E. Lascano, M. Kreuzer and D. Hess. 2006. Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legumes mixtures with contrasting tannin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* Doi:10.1016/j.anifeeds.2006.11.008
- Theodorou, M. K. and B. A. William. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Tilley, J. M. A and R. Terry. 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-111.
- Valencia, F. L. 2003. Efecto de la mezcla de leguminosas tropicales en relación con la presencia de taninos y emisiones de metano en un sistema *in vitro* (rusitec). Tesis de Magister. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 83 p.