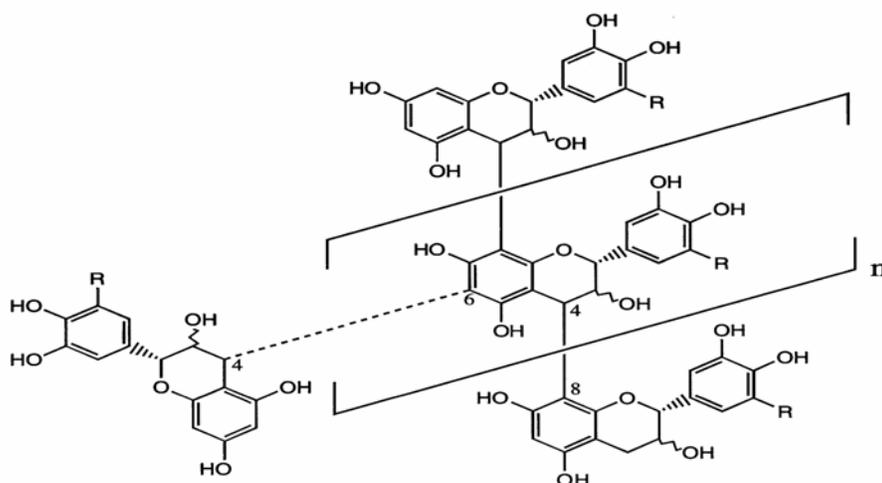


# Segundo Taller Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia

30 de Noviembre y 1 de Diciembre 2006



**Editores:**  
**Hans Dieter Hess**  
**Julia Gómez**  
**Carlos E. Lascano**

**ETH**

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Swiss Confederation

Federal Department  
of Economic Affairs DEA  
Agroscope Liebefeld-Posieux  
Research Station ALP

## Socios

### ETH

ETH Zurich es una universidad dedicada a la ciencia y tecnología, cuya trayectoria de investigación es sobresaliente.

ETH Zurich es el sitio de estudio, investigación y trabajo de 18,000 personas procedentes de 80 naciones. Sus 15 departamentos cuentan con 350 profesores distinguidos que enseñan en las áreas de ciencias de ingeniería y arquitectura, ciencias orientadas hacia sistemas, matemáticas y ciencias naturales, y que hacen investigación que es altamente reconocida en todo el mundo.

Como una institución de educación superior orientada internacionalmente y fundamentada a nivel nacional, esta tarea progresiva es cumplida en función de la nación suiza.

Veintinueve laureados del Premio Nobel están relacionados con ETH Zurich. Mantener y desarrollar su posición como una de las primeras universidades a nivel internacional es una labor importante de ETH Zurich.

### CIAT

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) es una organización sin ánimo de lucro, que realiza investigación avanzada en los campos social y ambiental con el objetivo de mitigar el hambre y la pobreza y preservar los recursos naturales en países en desarrollo. El CIAT es uno de 15 centros que son financiados principalmente por 64 países, fundaciones privadas y organizaciones internacionales que constituyen el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCAI).

El CIAT recibe también fondos para servicios de investigación y desarrollo que se prestan, bajo contrato, a un número creciente de clientes institucionales.

La información y las conclusiones contenidas en esta publicación no reflejan necesariamente los puntos de vista de los donantes.

### ALP

Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) es un centro experimental que realiza investigación a lo largo de la cadena alimenticia incluyendo la calidad de alimentos para animales domésticos, la nutrición animal, la producción de carne y leche y el procesamiento de productos cárnicos y lácteos. Es el objetivo de ALP de contribuir a la elaboración de productos cárnicos y lácteos sanos, seguros y de alta calidad, de mejorar la competitividad y la sostenibilidad de la producción agropecuaria y de soportar sistemas de producción en áreas remotas.

ALP hace parte de un grupo de centros experimentales de la Oficina Federal de Agricultura y que es financiado principalmente por el Ministerio Federal de Economía.

### Universidad Nacional de Colombia

La Universidad tiene como propósito acrecentar el conocimiento a través de la investigación, transmitir el saber a través del proceso de enseñanza aprendizaje, e interactuar con las nuevas realidades nacionales, liderando los cambios que requiere el Sistema de Educación Superior.

A su vez busca la formación de individuos fundamentada en los códigos propios de la modernidad (ciencia, ética y estética), con una gran capacidad de abstracción, aptos para la experimentación, el trabajo en equipo y con gran capacidad de adaptación al cambio.

## Donantes

### ZIL

El Centro Suizo para la Agricultura Internacional (ZIL) es una asociación de investigadores del Instituto Federal de Tecnología (ETH) en Zurich, Suiza. Es la visión del ZIL de promover la contribución de la investigación agropecuaria al desarrollo sostenible con el objetivo de aliviar la pobreza, mejorar la seguridad alimenticia y lograr un manejo ecológico de los recursos ambientales para el beneficio de las presentes y futuras generaciones.

El ZIL es financiado principalmente por la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), la ETH y un número creciente de otros donantes.



Prueba de cafetería para evaluación de palatabilidad en una colección de *Flemingia macrophylla* en la estación de Quilichao, Cauca, Colombia.

(Foto tomada por Belisario Hincapié)

ISBN 958694087X

# Segundo Taller Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia

30 de Noviembre y 1 de Diciembre 2006

**Editores:**  
**Hans Dieter Hess**  
**Julia Gómez Quintero**  
**Carlos E. Lascano**

**ETH**

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich



**Swiss Centre for International Agriculture**  
**Schweizerisches Zentrum für Internationale Landwirtschaft**  
**Centre Suisse pour l'Agriculture Internacionale**



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Swiss Confederation

Federal Department  
of Economic Affairs DEA  
**Agroscope Liebefeld-Posieux**  
Research Station ALP

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)  
*International Center for Tropical Agriculture*  
Apartado Aéreo 6713  
Cali, Colombia

Federal Department of Economic Affairs DEA  
Research Station for Animal Production and  
Dairy Products Agroscope Liebefeld-Posieux ALP  
Tiöleyre 4, CH-1725 Posieux  
Switzerland

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich  
Institute of Animal Science  
Animal Nutrition ETH Zentrum LFW B 56  
CH-8092 Zurich  
Switzerland

Universidad Nacional de Colombia  
Departamento de Química  
Facultad de Ciencias  
Carrera 30 No. 45-03  
Santafé de Bogotá, Colombia

Publicación CIAT No. 352  
ISBN 958-694-087-X  
Tiraje: 100 copias  
Impreso en Colombia  
Noviembre 2006

Taller Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia (2, 2006, Cali, Colombia).

Memorias/editores: Hans Dieter Hess, Julia Gómez, Carlos E. Lascano -- Cali, CO :  
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2006.  
52 p. -- (Publicación CIAT no. 352)  
ISBN 958694087X

Descriptores AGROVOC:

1. Taninos. 2. Leguminosas forrajeras. 3. Plantas de ramoneo. 4. Nutrición animal. 5. Rumiante. 6. Ganado bovino. 7. Ovinos. 8. *Calliandra calothyrsus*. 9. *Cratylia*. 10. *Flemingia macrophylla*. 11. *Leucaena leucocephala*. 12. *Desmodium ovalifolium*. 13. *Vigna unguiculata*. 14. Digestión ruminal. 15. Fermentación. 16. Polifenoles. 17. Digestibilidad. 18. Proteínas. 19. Colombia

Descriptores Locales

1. *Cratylia argentea*. 2. Leguminosas arbustivas

Categoría de Materia AGRIS: L02 Alimentación animal

AGROVOC Descriptors:

1. Tannins. 2. Feed legumes. 3. Browse plants. 4. Animal nutrition. 5. Ruminants. 6. Cattle. 7. Sheep. 8. *Calliandra calothyrsus*. 9. *Cratylia*. 10. *Flemingia macrophylla*. 11. *Leucaena leucocephala*. 12. *Desmodium ovalifolium*. 13. *Vigna unguiculata*. 14. Rumen digestion. 15. Fermentation. 16. Polyphenols. 17. Digestibility. 18. Proteins. 19. Colombia

Local Descriptors

1. *Cratylia argentea*. 2. Browse legumes

AGRIS Subject Categories: L02 Animal feeding

I. Hess, Hans Dieter. II. Gómez, Julia. III. Lascano, Carlos E. IV. Centro Internacional de Agricultura Tropical. V. Ser.:

Clasificación LC.: SB 203 .3 .C6 T3

Derechos de Autor CIAT 2006. Todos los derechos reservados

El CIAT propicia la amplia disseminación de sus publicaciones impresas y electrónicas para que el público obtenga de ellas el máximo beneficio. Por tanto, en la mayoría de los casos, los colegas que trabajan en investigación y desarrollo no deben sentirse limitados en el uso de los materiales del CIAT para fines no comerciales. Sin embargo, el Centro prohíbe la modificación de estos materiales y espera recibir los créditos merecidos por ellos. Aunque el CIAT elabora sus publicaciones con sumo cuidado, no garantiza que sean exactas ni que contengan toda la información.

## CONTENIDO

	Página
Efecto del sitio de producción en la composición química y las características de fermentación ruminal de <i>Calliandra calothyrsus</i> var. Patulul. <b>H. D. Hess, F. Noto y T. T. Tiemann</b>	1
Efecto de localidad y nivel de fertilización en la producción de biomasa de leguminosas arbustivas. <b>T. T. Tiemann, L. H. Franco, C. Plazas, P. Avila, G. Ramírez, H. D. Hess y C. E. Lascano</b>	4
Métodos de extracción y caracterización de taninos condensados, utilizados en CIAT, ventajas y desventajas. <b>P. Avila</b>	7
Estudio químico preliminar de los polifenoles de dos accesiones de <i>Calliandra calothyrsus</i> . <b>B. Moreno, A. Sánchez, R. Quevedo, M. Pabón, y J. E. Carulla</b>	10
Análisis de taninos: Astringencia, composición química y peso molecular. <b>T. T. Tiemann, P. Avila, R. Barahona y H. D. Hess</b>	13
Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal. <b>T. T. Tiemann, P. Avila, G. Ramírez, H. D. Hess, y C. E. Lascano</b>	15
Efecto de taninos de cuatro leguminosas sobre la digestión in vitro de proteína. <b>J. E. Cortés, B. Moreno, M. L. Pabón y J. E. Carulla</b>	18
Efecto de la adición de taninos condensados de <i>Leucaena leucocephala</i> y <i>Desmodium ovalifolium</i> sobre las poblaciones de bacterias celulolíticas y parámetros fermentativos durante la degradación in vitro de alfalfa. <b>C. P. Sanabria, R. Barahona, M. Kreuzer, D. A. Rodríguez, E. M. Martínez y F. Rodríguez</b>	22
Dinámica de fermentación ruminal de mezclas de leguminosas con contenidos y tipos de taninos contrastantes. <b>H. D. Hess, C. D. Stürm y T. T. Tiemann</b>	27
Efecto de la inclusión de forraje de <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Flemingia macrophylla</i> y <i>Calliandra calothyrsus</i> a una dieta basal de <i>Brachiaria humidicola</i> sobre los principales grupos de microorganismos ruminales y parámetros de fermentación in vitro. <b>C. P. Sanabria, R. Barahona, T. T. Tiemann, C. E. Lascano, E. M. Martínez y F. Rodríguez</b>	30
Monitoreo de la dinámica poblacional in vivo de los principales grupos de microorganismos ruminales en respuesta a la inclusión de <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Flemingia macrophylla</i> y <i>Calliandra calothyrsus</i> en la dieta de ovinos africanos. <b>C. P. Sanabria, R. Barahona, L. M. Monsalve, T. T. Tiemann, C. E. Lascano, H. D. Hess, E. M. Martínez y F. Rodríguez</b>	35

## **Contenido... (continuación)**

Valor nutricional de ensilajes y henos de mezclas de leguminosas con y sin taninos. <b>L. Bernal, P. Avila y C. E. Lascano</b>	39
Efecto de leguminosas con taninos en la emisión de metano en ovinos. <b>T. T. Tieman,</b> <b>H. R. Wettstein, P. Avila, M. Kreuzer y H. D. Hess</b>	42
Fermentación ruminal, flujo de proteína al duodeno y absorción de N en ovinos alimentados con mezclas de leguminosas. <b>L. M. Monsalve, P. Avila y C. E. Lascano</b>	44
Valor como fertilizante del estiércol de ovinos alimentados con leguminosas con taninos. <b>T. T. Tiemann, P. Avila, I. M. Rao, H. D. Hess y C. E. Lascano</b>	48
Producción de leche de vacas en pastoreo suplementadas con mezclas de leguminosas con y sin taninos. <b>L. Bernal, P. Avila y C. E. Lascano</b>	50

## PREFACIO

En las últimas dos décadas ha existido interés por parte de investigadores en identificar especies arbóreas leguminosas y no leguminosas para la alimentación de rumiantes. En gran medida este interés ha surgido de la necesidad de seleccionar especies como fuente de forraje de buena calidad para sitios con períodos prolongados de sequía. Existen evidencias que demuestran que con el uso del forraje de leguminosas arbustivas se pueden mejorar en forma económica y ecológica parámetros de producción animal. Sin embargo, las especies de leguminosa que han recibido mayor atención por parte de investigadores son aquellas que no son o muy tolerantes a la sequía o que no se adaptan bien a suelos ácidos de baja fertilidad. Por lo tanto, el CIAT en colaboración con diferentes instituciones de investigación ha venido evaluando leguminosas arbóreas por su adaptación a suelos ácidos de baja fertilidad y a condiciones de sequía.

En muchas especies de leguminosas seleccionadas por su adaptación a estreses abióticos se ha encontrado que hay concentraciones variables de taninos condensados, los cuales son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas dicotiledóneas y menos en monocotiledóneas. Estos compuestos que son polifenoles tienen la habilidad de formar enlaces con proteínas y otros compuestos orgánicos y minerales. Se ha postulado que los complejos entre taninos condensados y proteínas son reversibles o irreversibles dependiendo del tipo de enlace. Los enlaces reversibles de taninos con proteínas son de interés para los nutricionistas animales, pues esta reversibilidad podría ser utilizada para

diseñar mezclas de leguminosas con y sin taninos como estrategia para reducir pérdidas de amonio en el rumen y para aumentar la proporción de proteína sobre-pasante en la dieta. Sin embargo, para poder explotar mediante mezclas los beneficios potenciales de los taninos condensados presentes en algunas leguminosas arbustivas es necesario investigar cómo su concentración, estructura química y actividad biológica cambia debido a especies y a factores ambientales.

En este Taller de Trabajo se resumen los trabajos de investigación realizados por un grupo de investigadores de instituciones en Suiza (ETH y Agroscope) y Colombia (CIAT, CORPOICA y Universidad Nacional de Colombia) con fondos provenientes de ZIL-SDC, Suiza. El reto de estos investigadores ha sido el de definir cómo factores edafoclimáticos afectan la producción de biomasa, y la concentración, actividad biológica y estructura de taninos condensados presentes en especies de leguminosas arbustivas. Adicionalmente, se evaluó la estrategia de hacer mezclas de leguminosas con y sin taninos en términos de patrones de fermentación de MO y digestión de proteínas en sistemas *in vitro* e *in vivo*. La utilidad de las mezclas de leguminosas en términos de producción animal se evaluó en un ensayo de pastoreo con vacas lecheras. Como parte integral de los estudios sobre la utilidad de los taninos se evaluó también cómo diferentes mezclas de leguminosas con y sin taninos afectan las poblaciones de microorganismos ruminales utilizando métodos moleculares y la calidad del estiércol producido por animales recibiendo esas mezclas.

Sin duda los trabajos resumidos en estas memorias constituyen un avance en nuestra capacidad de entender mejor los procesos asociados con la acumulación y los cambios en estructura y actividad biológica de taninos condensados en leguminosas tropicales. Los

Carlos E. Lascano  
Líder Forrajes Tropicales  
CIAT

estudios in vitro e in vivo con mezclas de leguminosas también aportan elementos para el diseño de prácticas de alimentación basadas en leguminosas arbustivas que podrían ser atractivas a productores de ganado en los trópicos.

# Efecto del sitio de producción en la composición química y las características de fermentación ruminal de *Calliandra calothyrsus* var. Patulul

Hans Dieter Hess<sup>1</sup>, Fabio Noto<sup>2</sup> y Tassilo T. Tiemann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-1725 Posieux, Suiza, [dieter.hess@alp.admin.ch](mailto:dieter.hess@alp.admin.ch)

<sup>2</sup>ETH Zurich, Instituto de Ciencia Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza

## INTRODUCCION

La deficiente calidad de muchos forrajes tropicales junto con una baja eficiencia de conversión de los alimentos resulta en bajos niveles de producción animal. La deficiencia de proteína es la más importante causa nutricional de la baja producción de rumiantes alimentados con forrajes tropicales de baja calidad. Por lo tanto asegurar niveles adecuados de amonio para los microorganismos en el rumen tiene primera prioridad en la optimización de la fermentación y digestión de forrajes. En este contexto el follaje de árboles y arbustos forrajeros representa una alternativa de suplementación interesante. Estas especies pueden ser cultivadas por cualquier tipo de ganadero tanto en fincas grandes como en fincas pequeñas y en general su follaje presenta mayores contenidos de proteína degradable y no degradable que la mayoría de gramíneas y residuos de cosecha que son usados comúnmente en la alimentación de rumiantes. La leguminosa arbustiva *Calliandra calothyrsus* tiene excelentes características agronómicas y una alto contenido de proteína. Sin embargo su valor nutricional está limitado por baja palatabilidad y alto contenido de taninos condensados. Mientras que en Kenia *C. calothyrsus* es comúnmente utilizado en la suplementación de vacas y cabras lecheras, esta estrategia de suplementación no ha sido adoptada por ganaderos en Colombia. Un estudio *in vitro* realizado previamente en Colombia mostró que la suplementación de una gramínea de baja calidad con *C. calothyrsus* cultivado en un suelo ácido y de baja fertilidad no mejoró el valor nutricional de la dieta (Hess et al.,

2003). Esto sugiere que diferencias en el valor nutricional de *C. calothyrsus* podrían estar involucradas en las tasas de adopción contrastantes observadas en los dos países. Para comprobar esta hipótesis se realizó un experimento *in vitro* comparando el valor nutricional y las características de fermentación ruminal de *C. calothyrsus* var. Patulul cultivado en Colombia o en Kenia usándolo como suplemento en una dieta basal de baja calidad.

## MATERIALES Y METODOS

En este experimento se evaluaron una dieta de gramínea sola (control negativo), una dieta suplementada con urea (control positivo) y cinco dietas suplementadas con follaje de leguminosas. Los suplementos de leguminosas (33% de la materia seca de la dieta) consistieron de *Cratylia argentea* (100%), *Calliandra Colombia* (100%), *Calliandra Kenia* (100%), o mezclas (1:1) de *Cratylia* con *Calliandra Colombia* o *Calliandra Kenia*. El follaje de *C. calothyrsus* var. Patulul fue cosechado de plantas cultivadas en Colombia o en Kenia y secado al horno a 50°C. La gramínea (*Brachiaria humidicola*) y el follaje de *Cratylia* fueron cosechados en Colombia y secados al sol. Las diferentes mezclas experimentales fueron evaluadas empleando una técnica de simulación ruminal (RUSITEC) (Czerkawski y Breckenridge, 1977) durante 4 periodos de 10 días cada uno (n=4). Cada periodo consistió en 4 días de adaptación y 6 días de toma de muestras y colección de datos.

## RESULTADOS

La gramínea *B. humidicola* presentó un contenido de proteína cruda (PC) muy bajo y contenidos de fibra en detergente neutro (FDN) y de fibra en detergente ácido (FDA) altos. Independiente de la especie y del sitio de producción, el follaje de leguminosas presentó contenidos de PC más altos y de FDN y FDA más bajos que la gramínea (Cuadro 1). El contenido de PC de las dos especies de leguminosa fue relativamente similar pero los contenidos de FDN y de FDA fueron más altos en Cratylia que en Calliandra. Calliandra-Colombia y Calliandra-Kenia presentaron contenidos similares de materia orgánica (MO), PC y fibra, pero el contenido de taninos condensados fue casi dos veces más alto en Calliandra-Colombia que en Calliandra-Kenia.

La concentración de amonio en el líquido de fermentación incrementó ( $P<0.05$ ) cuando se suplementó urea o Cratylia sola pero no varió ( $P>0.05$ ) por la suplementación con Calliandra sola. Mientras que la suplementación con la mezcla de leguminosas conteniendo Calliandra-Kenia incrementó ( $P<0.05$ ) la concentración de amonio, la mezcla conteniendo Calliandra-Colombia no tuvo efecto ( $P>0.05$ ) sobre esta variable. Independiente del sitio de producción, la concentración de amonio se disminuyó en forma lineal ( $P<0.05$ ) cuando se incrementó la proporción de Calliandra en la dieta. En promedio la suplementación con Calliandra-Kenia resultó en una concentración de amonio más alta ( $P<0.05$ ) que la suplementación con Calliandra-Colombia. Las concentraciones de protozoarios y de bacterias totales no estuvieron afectados ( $P>0.05$ ) por el tipo de suplementación.

La degradación aparente de la materia orgánica (MO) incrementó ( $P<0.05$ ) con todos los tipos de suplementación, excepto cuando el suplemento consistió en Calliandra-Colombia sola (Cuadro 2). La degradación aparente de PC incrementó ( $P<0.05$ ) cuando se suplementó con urea o Cratylia, no fue afectada ( $P>0.05$ ) por la suplementación con las mezclas de leguminosas y disminuyó ( $P<0.05$ ) cuando se suplementó solamente con Calliandra-Colombia o Kenia. La suplementación con urea, Cratylia o las mezclas de leguminosas incrementó ( $P<0.05$ ) la degradación aparente de la FDN pero la suplementación con Calliandra sola no tuvo efecto ( $P>0.05$ ) sobre esta variable. Independiente del sitio de producción la degradación aparente de MO, PC y FDN se disminuyó en forma lineal ( $P<0.05$ ) cuando se incrementó la proporción de Calliandra en la dieta. Sin embargo en promedio la degradación aparente de nutrientes fue mayor ( $P<0.05$ ) en las dietas que contenían Calliandra-Kenia que en las dietas con Calliandra-Colombia.

El suministro de nitrógeno (N) a los fermentadores incrementó ( $P<0.05$ ) con todos los suplementos. Sin embargo, dependiendo del tipo de suplemento, se presentaron cambios en las diferentes fracciones de N. La proporción de N recuperado como amonio se incrementó ( $P<0.05$ ) cuando se suplementó urea o Cratylia, pero la suplementación con Calliandra sola o en mezcla con Cratylia no afectó ( $P>0.05$ ) esta fracción de N. La fracción de N aparentemente no degradado (“bypass”) incrementó ( $P<0.05$ ) cuando se suplementó con Calliandra sola, pero no fue afectada ( $P>0.05$ ) por la suplementación con las mezclas y disminuyó ( $P<0.05$ ) cuando se suplementó con urea o con Cratylia. En comparación con Calliandra Colombia la

**Cuadro 1.** Composición química (mg/g de materia seca) de los forrajes experimentales.

	Brachiaria	Cratylia	Calliandra	
			Colombia	Kenia
Materia orgánica	889	925	937	944
Proteína cruda	35	228	205	220
Fibra en detergente neutro	720	479	260	285
Fibra en detergente ácido	392	343	203	252
Taninos condensados	n.d. <sup>1</sup>	n.d.	405	234

<sup>1</sup>no detectado.

**Cuadro 2.** Degradación aparente (mg/g) de materia orgánica (MO), proteína cruda (PC) y fibra en detergente neutro (FDN) de dietas suplementadas con urea o follaje de leguminosas.

Tipo de suplemento	Degradación aparente (mg/g)		
	MO	PC	FDN
Ninguno	254d <sup>1</sup>	460c	153c
Urea <sup>2</sup>	405a	692a	318a
Cratylia	424a	560b	312a
Cratylia & Calliandra Colombia	382ab	441c	255ab
Cratylia & Calliandra Kenia	389ab	478c	259ab
Calliandra Colombia	287cd	270e	135c
Calliandra Kenia	336bc	358d	204bc
Error estándar de la media	12.2	15.6	18.8
Calliandra Colombia vs. Kenia <sup>3</sup>	*	***	+

<sup>1</sup>Medias dentro de una columna seguidas por letras distintas son diferentes,  $P < 0.05$ .

<sup>2</sup>Suplementado con 9.5 mg de urea por gramo de materia seca.

<sup>3</sup>Significancia del contraste ortogonal Colombia vs. Kenia: +,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

suplementación con Calliandra Kenia resultó en proporciones más elevadas de N degradado, de N recuperado como amonio y de N aparentemente incorporado en proteína microbiana, pero en una proporción menor ( $P < 0.001$ ) de N aparentemente no degradado.

## CONCLUSIONES

A pesar de presentar similares contenidos de MO, PC y FDN, los dos materiales de Calliandra evaluados en este estudio difirieron en prácticamente todas las características de fermentación ruminal. El follaje de *C. calothyrsus* var. Patulul cultivado en Kenia presentó un valor nutricional más alto que follaje de la misma variedad de Calliandra cultivado en Colombia. Esto se debe principalmente a un contenido más bajo de taninos condensados en el follaje producido en Kenia (234 vs. 405 mg/g de materia seca). Ambos materiales presentaron un valor nutricional mucho más bajo que el follaje de

Cratylia. Los efectos de la suplementación con urea sobre la fermentación ruminal fueron casi idénticos con los efectos causados por la suplementación con Cratylia. Esto indica que los efectos causados por Cratylia fueron principalmente el resultado de una mayor disponibilidad de compuestos nitrogenados fermentables.

## LITERATURA CITADA

- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, Díaz, T.E. y Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 703-713.
- Czerkawski, J.W. y Breckenridge, G., 1977. Desing and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* **38**: 371-384.

## Efecto de localidad y nivel de fertilización en la producción de biomasa de leguminosas arbustivas

Tassilo T. Tiemann<sup>1</sup>, Luis H. Franco<sup>2</sup>, Camilo Plazas<sup>3</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup>,  
Gerardo Ramirez<sup>2</sup>, Hans Dieter Hess<sup>4</sup> y Carlos E. Lascano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza,  
ttiemann@inw.agrl.ethz.ch

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT),  
Cali, Colombia

<sup>3</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, CIAT, Santa Rosa, Villavicencio, Colombia

<sup>4</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-1725 Posieux, Suiza

### INTRODUCCION

Muchas leguminosas contienen compuestos secundarios como taninos o saponinas que pueden afectar su calidad como planta forrajera. El tipo y las concentraciones de esos compuestos secundarios en plantas pueden verse afectados por factores del medio ambiente tales como la fertilidad de los suelos (Häkkinen y Törrönen, 2000; Hess et al., 2006). Sin embargo, muchos de los trabajos que han medido el efecto de fertilidad de suelos en producción y calidad de leguminosas tropicales con taninos han sido realizados con pocas especies. Por lo tanto se diseñó un estudio para evaluar el efecto de sitios con fertilidad de suelos contrastantes y con niveles diferentes de fertilidad dentro de sitio en producción y calidad de varias especies de leguminosas arbustivas forrajeras. En este resumen solo se discuten resultados de producción de biomasa en función de localidad y fertilización dentro de localidad.

### MATERIALES Y METODOS

En el año 2004 se establecieron dos lotes experimentales en dos sitios contrastantes con cinco leguminosas arbustivas (*Calliandra calothyrsus*, *Cratylia argentea*, *Desmodium velutinum*, *Flemingia macrophylla* y *Leucaena leucocephala*). El primer lote se ubicó en el CIAT, sede principal Palmira, se caracteriza por tener suelos del tipo Mollisol, con pH alrededor de 7.5 y pobres en hierro y

zinc. La precipitación es bimodal con un promedio anual de 896 mm y una temperatura promedio de 24.3°C. El segundo lote se ubicó en los Llanos Orientales en el departamento del Meta en la finca Matazúl y se caracterizó por tener suelos Oxisoles, con pH 4.5, deficientes en P, altos en Al y bajos en bases intercambiables y en materia orgánica. La precipitación es unimodal (Abril y Noviembre) con un promedio de 2250 mm al año, con una temperatura promedio de 26°C.

En los dos sitios se llevó a cabo un experimento (llamado de aquí en adelante Experimento 1) con dos niveles de fertilización, alto ([kg/ha]: 50 P, 60 K, 1000 dolomita, 40 S) y bajo ([kg/ha]: 20 P, 20 K, 500 Ca, 10 S), para evaluar el efecto de fertilización en la producción y calidad de forraje. En Matazúl se estableció además un segundo experimento (Experimento 2) en el cual se aplicaron cuatro niveles de fertilización (baja fertilización, alta fertilización, alta sin S, alta sin P). Las plantas fueron cultivadas en pots Jiffy y se trasplantaron después de 6 a 7 semanas, al principio de la época de lluvias. Después de un año de establecimiento y crecimiento se cortaron las plantas por primera vez. Posteriormente cada 9 semanas se ejecutó un corte de mantenimiento. En la época seca y la de lluvias se realizó un muestreo, cosechando 5 plantas al azar de cada especie, tratamiento y replica. Junto con estos cortes se evaluaron diferentes parámetros agronómicos como

supervivencia, vigor de plantas, producción de biomasa y relación hoja:tallo. El material cosechado se secó a 105°C por 96h para determinar la materia seca. Para el análisis cualitativo las muestras fueron guardadas en hielo y congeladas después a -20°C.

## RESULTADOS

### *Experimento 1: Efecto del sitio*

En los suelos ácidos en Matazul, *Leucaena* mostró la tasa de supervivencia más baja y el menor rendimiento entre todas las especies sembradas y no llegó a la altura de corte. Por tal razón esta especie se eliminó del análisis comparativo entre sitios. Las demás especies sobrevivieron de 94-100% sin diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre especies y niveles de fertilización.

En Palmira, con suelos más fértiles y pH neutro, *Leucaena* y *Desmodium* mostraron los mayores tasas de supervivencia (100%), seguidas por *Calliandra* (97.5%), *Flemingia* (89%) y como último *Cratylia*. Sin embargo, en el caso de *Cratylia* la fertilización mejoró su supervivencia de 77 a 88% mientras en las demás especie no se observó tal efecto.

En Matazul, la aplicación de fertilizante aumentó ( $P<0.001$ ) la producción de biomasa de 88 a 147 g materia seca (MS) por planta como promedio a través de especies. *Cratylia* mostró el mayor incremento (26 a 112 g MS por planta) debido a fertilización mientras que *Flemingia* mostró la menor respuesta (de 166 a 179) a fertilización en suelos ácidos. Independiente de la fertilización *Flemingia* y *Calliandra* presentaron mayores rendimientos (173 g y 139 g, respectivamente) que *Desmodium* y *Cratylia* (90 y 69 g, respectivamente). Excepto *Flemingia* que no mostró ninguna diferencia debida a localidad, la producción de biomasa fue 2 a 3 veces mayor en Palmira que en Matazul (interacción sitio x especie  $P<0.001$ ). *Flemingia* produjo entre 138 y 180 g de materia seca por planta en 9 semanas a través de sitio y fertilización dentro de sitio.

La producción de biomasa de las otras especies tendió a incrementar en Palmira debido a fertilización, pero en mucho menor grado que en Matazul. El mayor aumento debido a fertilización en Palmira se observó con *Leucaena* (50% más de rendimiento), mientras que con las otras especies el rendimiento se incrementó entre 5 y 20% en promedio. La fertilización también incrementó la relación entre biomasa verde y biomasa total. En promedio la producción de MS a través de sitios y niveles de fertilización fue mayor ( $P<0.05$ ) en *Calliandra* (200 g/planta) que en todas las otras especies (entre 133 y 162 g/planta). Solo comparando especies en Palmira, la *Leucaena* tuvo un 35% más de rendimiento con fertilizante y 85% sin fertilizante en comparación con las otras especies.

### *Experimento 2: Efecto de la fertilización*

La fertilización sin fósforo y azufre mostró efectos significativos en producción de biomasa pero influyó poco en la tasa de supervivencia y el vigor de plantas al establecimiento. Aunque ambos elementos tuvieron tenían un efecto ( $P<0.05$ ) en el rendimiento, la ausencia de P resultó en menor producción de MS que la ausencia de S ( $P<0.05$ ). Con el nivel de fertilización alto el rendimiento promedio a través de especies fue 168 g por planta, sin azufre de 132 g y sin fósforo de 99 g/planta. La producción de MS de *Calliandra* y *Cratylia* disminuyó en 50% sin P y 36% sin S; *Desmodium* y *Flemingia* mostraron menor reducción en rendimiento de MS debido a la deficiencia de P (35%) y S (6 a 10%).

## CONCLUSIONES

Estos experimentos corroboraron resultados de otros estudios que han mostrado que la selección de los sitios en términos de fertilidad de suelos es clave para definir “nichos” para leguminosas arbustivas con taninos. La bien conocida arbustiva *L. leucocephala* es sin duda la especie con la mayor capacidad de producción de biomasa en suelos fértiles con pH neutro con o sin fertilización. Sin embargo, los resultados reportados confirman que

*L. leucocephala* no está adaptada a suelos ácidos con altos niveles de Al como los que predominan en regiones como los Llanos Orientales. Para estos suelos una opción es *F. macrophylla* ya que su rendimiento de forraje fue mayor que el de las otras especies en la localidad con suelos ácidos independientemente del nivel de fertilización. La especie *C. calothyrsus* tuvo una alta producción de biomasa en los dos sitios con suelo contrastante lo cual sugiere que tiene un amplio rango de adaptación en comparación con las otras especies evaluadas.

## LITERATURA CITADA

- Häkkinen, S.H. y Törrönen, A.R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International* **33**: 517-524
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Franzel, S., Lascano, C.E. y Kreuzer, M., 2006. The effects of cultivation site on forage quality of *Calliandra calothyrsus* var. Patulul. *Agroforestry Systems* **68**: 209-220.

# Métodos de extracción y caracterización de taninos condensados, utilizados en CIAT, ventajas y desventajas<sup>1</sup>

Patricia Avila Vargas<sup>1</sup>

Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, [p.avila@cgiar.org](mailto:p.avila@cgiar.org)

## ANTECEDENTES

Los suplementos leguminosos (herbáceos, arbustos, y arbóreos) juegan un papel fundamental en el suministro de nitrógeno y energía en las dietas de los animales en regiones tropicales. Desafortunadamente muchas de las leguminosas conocidas no se adaptan a suelos ácidos. Por otra parte, leguminosas que se comportan relativamente bien en suelos ácidos con alta saturación de aluminio (*Flemingia macrophylla* Kuntze ex Merrill, *Calliandra grandiflora* L'Her Bentham) tienen altos niveles de taninos condensados (Lascano et al., 1994), que son compuestos que pueden limitar su valor como forraje debido a un bajo consumo, digestibilidad y utilización de nitrógeno por los rumiantes (Barry and Manley, 1984; Pritchard et al. 1988). Sin embargo, estudios realizados con algunas leguminosas tropicales y templadas muestran que los taninos condensados pueden tener efectos positivos en la nutrición animal dependiendo de su estructura y reactividad en el tejido de la planta (Ahn et al., 1989; Terrill et al., 1989; Barry, 1989; Kumar y Vaithyanathan, 1990; Robbins et al., 1991).

Para poder analizar la estructura química de los taninos presentes en leguminosas es necesario trabajar con taninos purificados.

En este trabajo se resumen dos metodologías para la extracción y purificación de taninos condensables en leguminosas tropicales.

## OBJETIVOS

Ilustrar métodos de extracción en taninos condensados utilizados en el Laboratorio de

Forrajes Tropicales del CIAT. Extracciones utilizadas para referenciar curvas estándares en la cuantificación de taninos condensados, además caracterizar la composición monomérica (pro-cianidin, pro-delfinidin y pro-pelargonidin) en leguminosas arbustivas de interés para el presente proyecto. Precisar dos metodologías de extracción de taninos con solventes orgánicos, ventajas y desventajas según método utilizado.

## PURIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS (PROTOCOLO A)

(Jones et al., 1976; Foo y Porter, 1981; Horigome et al., 1988)

### Reactivos

Solución extractora (taninos solubles): acetona 70% más ácido ascórbico 0.1%, éter dietílico, etil acetato, metanol (50%), acetona (70%), Sephdex LH-20.

### Procedimiento: Extracción y cuantificación de taninos libres o extractables

Pesar 15-20 g de forraje en elernmeyers de 250 ml y adicionar la solución extractora 45 ml (acetona más ácido ascórbico) hasta que quede totalmente mojado el forraje. Agitar por aproximadamente 75 minutos. Retirar la muestra de los elernmeyers y exprimirla en los embudos a los beakers utilizando doble gasa.

Transvasar la muestra exprimida de los elernmeyers a tubos falcon de 50 ml (dos tubos por muestra). Adicionar a los tubos igual cantidad de éter dietílico, agitar y succionar el éter por vacío, realizar este lavado por tres veces con similar volumen (10 ml/muestra). Repetir el paso anterior, pero adicionando esta

vez etil acetato, agitando y succionando por vacio. Hacer esto tres veces.

Evaporar la acetona, eter y etil acetato preferiblemente en un concentrador de muestras (con agujas). Almacenar las muestras en la nevera hasta el día siguiente.

Al otro día, agregar metanol 50% (50 ml) agitar con el vortex y centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Transvasar el sobrenadante a las botellas con sephadex con cuidado quedando en el fondo el pellet que se descarta.

Las botellas de sephadex más extractos de taninos se adiciona metanol 50% (130 ml) a cada botella. Agitar muy bien y luego centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm (botar el sobrenadante). Repetir el proceso de centrifugación de Sepadex más metanol hasta que el líquido quede trasparente. El número de centrifugaciones depende de la muestra. Cuando el líquido este transparente cambiar el metanol 50% por acetona al 70% y repetir las centrifugaciones por 5 minutos cada vez recuperando el sobrenadante en tubos nuevos con papel filtro. El sobrenandante recuperado en beakers llevar al concentrador de muestras para evaporar la acetona. Paso posterior congelar y llevar al liofilizador (2-3 días). El rendimiento de taninos purificados, varía según la especie de leguminosa.

Preparación del Sephadex: Compuesto que ayuda a extraer los taninos, se pesan 10 g de Sephadex LH-20 se adiciona metanol 50% (130 ml), centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. (repetir este paso por 3 veces). Almacenar en nevera, proteger de la luz.

#### *Ventajas*

- Se obtiene una extracción más uniforme de los pigmentos clorofilicos por los solventes orgánicos (eter dietílico y etil acetato).
- Posiblemente una muestra más homogénea y reperesentativa de los taninos purificados en la leguminosa (ver resumen de resultados de los análisis químicos y moleculares de los taninos en estas memorias).

- El rendimiento por columna de Sephadex utilizada es más eficiente, menor contaminación del Sephadex. La columna se puede utilizar en otros purificaciones después de ser recuperada con metanol.

#### *Desventajas*

- Se incrementa el costo por muestra purificada al utilizar los reactivos eter dietilico, etil acetato y metanol. Reactivos controlados por oficina de estupefacientes, hacen que sea de uso restringido.
- Requiere mayor tiempo y cuidado en los proceso de extracción y concentración de la muestra (ver resumen de resultados de los análisis químicos y moleculares de los taninos en estas memorias).
- No se descarta la posibilidad de perder algunos taninos en el proceso de arrastre con Sephadex, cuando se extraen con acetona en la etapa final de la extracción.

### **PURIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS (PROTOCOLO B)**

(Carulla, comunicación personal)

#### *Reactivos*

Solución extractora (taninos solubles): alcohol al 96% en (70%), agua destilada en (30%), acido fórmico (0.5%), acido ascórbico (0.05%).  
Preparación de acetona al 50%: 500 ml de acetona más 500 ml de agua destilada.  
Preparación de Sephadex LH-20: pesar 15 g de Sephadex LH-20 y adicionar alcohol al 96%, refrigerar un día antes.

#### *Procedimiento*

Se pesa en elermeyer 40 g de leguminosa (liofilizada). Adicionar solución extractora 400 ml de solución, agitar en el shaker (60 minutos). Posteriormente la mezcla será filtrada, alistar previamente beaker, embudo filtro (whatman-fibra de vidrio cat1820 de 150 mm de diametro) y gaza doble. El filtrado se pone en el concentrador por espacio de 30 minutos para nivelar los volúmenes. Tener previamente la columna de sephadex y centrifugar con alcohol al 96% hasta que este completamente transparente.

Cuando está listo, cambiar el proceso con acetonal al 50% y alistar beaker pirex con filtros cat 1001 de 150 mm para recoger el sobrenadante que contiene los taninos. Se lleva al concentrador para eliminar completamente el olor de la acetona. Una vez evaporada se coloca gaza a los beaker y se llevan al congelador para posterior proceso de liofilización.

#### Ventajas

- El proceso de extracción de los taninos es más agil, se incrementa el número de muestras por día, sin afectar rendimiento de los mismos.
- El costo por muestra purificada disminuye al no utilizar los reactivos eter dietílico, etil acetato y metanol. Que son de uso restringido.
- El uso de alcohol permite que la técnica de extracción sea menos contaminante, pues no se usa el metanol.

#### Desventajas

- Aún que no se afecta el rendimiento, queda por definir con la ayuda de la cromatografía líquida, la similitud respecto a la concentración de las proantocianidinas.
- La columna de sephadex tiene menor vida útil, los pigmentos clorofilicos quedan adherida a ella y se hace más lenta su recuperación.

#### LITERATURA CITADA

Ahn, J.H., Robertson, B.M., Elliot, R.C. Y Ford, C.W. 1989. Quality assessment of tropical browse legumes: Tannin content and protein degradation. *Animal Feed Science and Technology* **27**: 147-156.

Barry, T.N. 1989. Condensed tannins: their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effects upon the rumen ecosystem. En: Nolan, J.V., Leng,

R.A., Demeyer, D.I. (eds.). *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Armidale NSW 2351, Australia: Penambul Books.

- Barry, T.N. y Manley, T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition* **51**: 493-504.
- Horigome, T., Kumar, R. y Okamoto, K. 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *British Journal of Nutrition* **60**: 275-285.
- Kumar, R. y Vaithyanathan, S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology* **30**: 21-38.
- Jones, W.T., Broadhurst, R.B. y Littleton, J.W. 1976. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry* **15**: 1407-1409.
- Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A. y Donnelly, D.M.X. 1997. Extractable and non extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry* **45**: 405-410.
- Lascano, C.E., Maass, B., López, E.V. y Argel, P. 1994. Potential for development and priorities for research into *Leucaena* in Central and South America. Paper presented in the *Leucaena R&D Workshop, Bogor, Indonesia*, 24-29 January, 1994.
- Robbins, C.T., Hagerman, A.E., Austin, P.J. McArthur, C y Hanley, T.A. 1991. Variation in mammalian physiological responses to a condensed tannin and its ecological implications. *J. Mamm.* **72**: 480-486.
- Terrill, T.H., Windhan, W.R., Hoveland, C.S. y Amos, H.E. 1989. Forage preservation method influences on tannin concentration, intake, and digestibility of *Sericea lespedeza* by sheep. *Agronomy Journal* **81**: 435-439.

## Estudio químico preliminar de los polifenoles de dos accesiones de *Calliandra calothyrsus*

Bárbara Moreno-Murillo<sup>1,3</sup>, Angélica Sánchez<sup>1</sup>, Rodolfo Quevedo<sup>1</sup>,  
Martha Pabón<sup>1,2</sup> y Juan E. Carulla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Dep. de Ciencias para la Producción Animal, Bogotá, Colombia, <sup>3</sup>[bdmorenom@unal.edu.co](mailto:bdmorenom@unal.edu.co)

### INTRODUCCION

Durante las últimas décadas las investigaciones en nutrición de rumiantes han promovido el uso de plantas forrajeras nativas, silvestres o cultivadas como suplemento por su alto contenido de proteína. Entre estas especies pertenecientes a la familia Leguminosae sobresalen algunas de los géneros *Lotus*, *Flemingia*, *Leucaena*, *Vigna* y *Calliandra* entre otras, las cuales pueden contener diferentes porcentajes de taninos condensados (TC, 0-30%) cuya presencia ofrece algunas propiedades útiles en el mejor aprovechamiento de los nutrientes y otras menos deseables como disminuir la digestibilidad del forraje. El objetivo de este trabajo es dar a conocer los resultados preliminares del estudio químico comparativo de la fracción de polifenoles presentes en los extractos alcohólicos ácidos de las hojas de dos accesiones de la especie *Calliandra calothyrsus* clasificadas por el CIAT con los códigos 22310 (CC1) y 22316 (CC2).

### MATERIALES Y METODOS

El procedimiento seguido en este estudio incluye la extracción de los polifenoles de las muestras, por el método propuesto por Carulla (2001) con algunas modificaciones menores, tal como elusión en columna de Sephadex LH-20 para así obtener dos fracciones a saber: la fracción M1 diluida con alcohol etílico para separar fenoles simples, flavonoides, algunos pigmentos residuales, y monómeros de las protoantociandinas y el residuo retenido en el gel, denominado muestra M2, el cual se extrae con mezcla acetona- agua (50%), se concentra y se liofiliza para dar la muestra de taninos

condensados. Las fracciones M1 y M2 fueron analizadas por técnicas cromatográficas tales como cromatografía en capa delgada unidimensional y bidimensional con varios diluentes para determinar diferencias entre las variedades.

Como los análisis anteriores presentaron diferencias de composición pequeñas pero reproducibles, las muestras se sometieron a análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Los primeros análisis, se realizaron utilizando como fase estacionaria una columna de 250 mm x 4 mm de diámetro con octadecilsilano (RP-C-18) de 10 µm, utilizando como diluentes diferentes mezclas de metanol-agua obteniéndose la mejor separación con un sistema de gradiente desde (90:10) hasta (77:23), observándose una mezcla muy compleja de separar pero mostrando pequeñas diferencias en tiempo de retención y concentración en los componentes minoritarios. Por lo anterior se utilizó como fase móvil un gradiente de acetonitrilo-agua y finalmente los resultados mejoraron con mezclas de metanol-acetonitrilo-agua. Sin embargo, la mayor parte de la muestra no presentó buena resolución.

Los resultados anteriores, condujeron a un cambio de fase estacionaria para lo cual se realizaron los análisis en la nueva fase constituida por gel de sílice modificada con cadenas tipo fenilhexilo promovidas como de mayor eficiencia para los polifenoles (LUNA 100 mm x 4 mm, 5 µm). Los resultados en esta fase mostraron mayor resolución observándose en los cromatogramas al menos 17

componentes para cada muestra, manteniéndose las pequeñas diferencias entre ellas, observadas previamente.

## RESULTADOS

El estudio cromatográfico de la muestra M1 de la variedad 22316, por cromatografía en capa delgada permitió reunir las fracciones de composición similar y por cromatografía en columna en gel de sílice repetitiva, de las nuevas fracciones obtenidas, se ha logrado la separación y purificación por cromatografía en capa delgada preparativa de dos isoflavonas puras, al parecer derivadas del núcleo de la genisteína, actualmente en estudio espectroscópico por IR, UV y RMN de  $^1\text{H}$ .

Las muestras M2 de cada accesión de Calliandra se sometieron a estudio por espectrometría de masas MALDI-TOF, de acuerdo a los procedimientos propuestos por Reed et al. (2005) utilizando tres matrices

diferentes a saber: ácido sinapínico, ácido dihidroxibenzoico (DHB) y ácido cianocinámico tanto para la muestra cruda como para la mezcla obtenida después de someter las muestras M2 a una hidrólisis con HCl 5% durante 6 horas. Los resultados muestran la presencia de dímeros y trímeros en mayor proporción en las dos accesiones pero con diferencias en el ensamble entre los monómeros reflejado en los valores de los iones moleculares observados (638353 Daltons, para la muestra 22310 y 616641 Daltons para la 22316), lo cual de nuevo, muestra la existencia de diferencias en la composición minoritaria de la fracción M2 de TC, en las dos accesiones como se observa a manera de ejemplo en la Figura 1. Los iones moleculares mayores, obtenidos por este método se observan en el rango de 1350 a 1600 Daltons (matriz DHB). Sin embargo en el espectro de las muestras hidrolizadas, hay un incremento en señales alrededor de 1140 a 1200 Daltons lo cual puede atribuirse a hidrólisis parcial de oligómeros superiores.

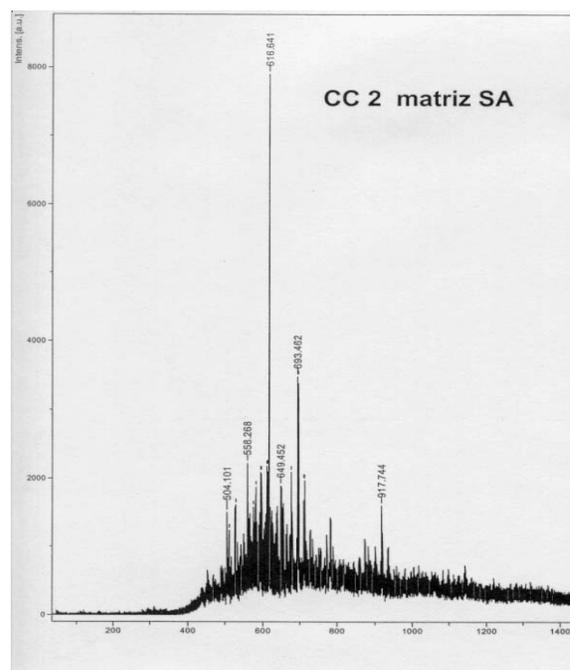
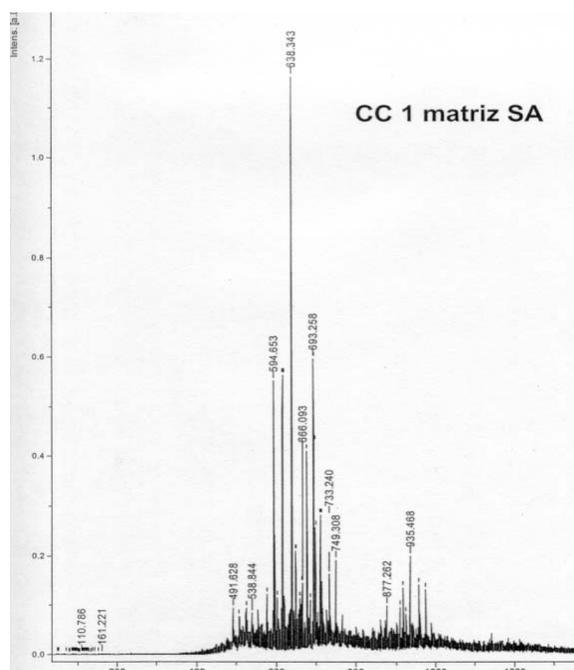


Figura 1. Registros por MALDI-TOF de las muestras de taninos condensados de dos accesiones Calliandra calothyrsus 22310 (CC1) y 22316(CC2) utilizando como matriz el ácido sinapínico (SA).

## CONCLUSION

Los estudios cromatográficos preliminares por CLAE (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) y espectrometría de masas MALDI-TOF en tres matrices diferentes, confirman la existencia de diferencias químicas cualitativas en las fracciones de taninos extraídas de las dos accesiones de la especie *Calliandra* bajo estudio.

## LITERATURA CITADA

- Carulla, J.E., Lascano, C.E. y Klopfenstein, T., 2001. Reduction of tannin level in tropical legume (*Desmodium ovalifolium*) with polyethylene glycol (PEG): effects on intake and N balance, digestion and absorption by sheep. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* **9**: 17-24.
- Reed, J.D., Krueger, C.G. y Vestling, M.M., 2005. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry* **66**: 2248-2263.

# **Análisis de taninos: Astringencia, composición química y peso molecular**

Tassilo T. Tiemann<sup>1</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup>, Ronaldo Barahona<sup>3</sup> y Hans Dieter Hess<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza, [ttiemann@inw.agrl.ethz.ch](mailto:ttiemann@inw.agrl.ethz.ch)*

<sup>2</sup>*Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia*

<sup>3</sup>*CORPOICA-Tibaitatá, Programa de Fisiología y Producción Animal, Santafé de Bogotá, Colombia*

<sup>4</sup>*Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-1725 Posieux, Suiza*

## **INTRODUCCION**

Los taninos condensados (TC) son un grupo de polifenoles altamente diversos y distribuidos en un gran número de especies vegetales. Su unidad básica es un núcleo de flavan, que está sujeto a varias modificaciones por la adición de diversos grupos químicos (generalmente son grupos hidroxilos) en diferentes posiciones. Los compuestos resultantes se clasifican principalmente en glucósidos y aglucósidos, dependiendo de si tienen un azúcar o no. Los TC son polímeros de una cantidad variable de unidades básicas (anthocianidinas, flavanoles etc.), y pueden ser condensados en cualquier orden de monómeros y por al menos 3 diferentes tipos de enlaces entre monómeros. Dependiendo de la concentración y posiblemente estructura química, los TC tienen efectos positivos o negativos. Un efecto positivo de cierto tipo de TC presentes en especies de leguminosas es que protegen la proteína vegetal de la degradación microbiana en el rumen y de esa forma la hacen disponible para el uso directo del animal (proteína de paso). Por otra parte, niveles altos de TC reducen la digestibilidad de la planta en rumiantes. Para poder predecir el efecto en animales de los taninos presentes en especies de leguminosas tropicales es necesario caracterizarlos no solamente en términos de su concentración en la planta pero también desde el punto de vista de su estructura química, peso molecular y actividad biológica.

## **MATERIALES Y METODOS**

Para medir astringencia, composición monomérica (proantocianidinas) y peso molecular de TC en leguminosas contrastantes, se extrajeron y purificaron los taninos de tres leguminosas taniníferas (*Calliandra calothyrsus* (CIAT 22310), *Flemingia macrophylla* (CIAT 17403) y *Leucaena leucocephala* (CIAT 734)) incluidas en un ensayo de campo en dos sitios con fertilidad de suelo contrastante (véase “Efecto de fertilización y ambiente en producción y calidad nutricional de leguminosas arbustivas” en estas memorias). De cada leguminosa se pesaron 40 g de material seco y molido para realizar una extracción con una solución de etanol 96%/agua destilada (700:300 ml), 5 ml de ácido fórmico y 0.5 g de ácido ascórbico. Luego de centrifugar el precipitado se almacenó en la nevera hasta la separación con Sephadex LH-20. Este Sephadex posteriormente se lavó con una solución de acetona/agua (50 vol%). Después de centrifugar y filtrar el Sephadex se evapora la acetona. La solución acuosa que resultó se congeló y luego se liofilizó para obtener los taninos purificados.

La astringencia se determinó con el método de difusión radial según el protocolo de Hagerman (1987). Para el análisis del peso molecular se aplicó el protocolo de Barahona (1999). La técnica utilizada se basa en la exclusión de tamaño de taninos por medio de un HPLC (size exclusion chromatography, SEC). Como fase móvil se utilizó DMF

(Dimetilformamide) 100% con 0.1% (p/v) litium bromide como secante. Como fase estacionaria se emplearon dos columnas de tipo tamiz molecular (Phenogel (GPC) 5 micras 500 Å, 300 x 7.8 mm) en línea con una precolumna. El HPLC utilizado estaba equipado con un detector de índice refractivo, con un flujo de 4.2 ml/minuto y una temperatura de 40°C. Para la generación de la curva de calibración se emplearon estándares de polietilen glicol de pesos moleculares entre 440 y 22800 Dalton (Polymer Laboratories, UK). Los taninos fueron diluidos en DMF y para la medición de PM se inyectaron 20 µl de la solución en el HPLC. Cada corrida se duró 45 minutos. El análisis de los monómeros se hizo según el método descrito por Stewart et al. (2000).

## RESULTADOS

### *Astringencia*

La prueba de astringencia mostró claramente diferencias ( $P < 0.001$ ) entre especies y niveles de fertilización ( $P < 0.05$ ) tanto en Matazúl como en Palmira. Los TC de Flemingia fueron más astringentes que los de Calliandra y Leucaena. Sin embargo, en Palmira no hubo diferencias significativas en la astringencia de TC entre Calliandra y Leucaena pero si entre estas dos y Flemingia. En ambas localidades la alta fertilización resultó en astringencia más alta ( $P < 0.05$ ) en los TC en comparación con la baja fertilización. La fertilización sin P o sin S no mostró efectos claros en la astringencia de los TC.

### *Peso molecular*

La técnica para la determinación del peso molecular de las diferentes fracciones de taninos reveló diferencias claras entre Calliandra y Flemingia pero no mostró ninguna diferencia entre sitios o fertilizaciones. Las fracciones de Calliandra fueron más livianas que las de Flemingia y de Leucaena. Mientras Calliandra mostró normalmente 3 fracciones entre 240 y 650 Dalton, Flemingia presentó una fracción encima de 2000 Dalton, una alrededor de 1000 Da y una en 350 Da. Por otra parte, Leucaena tuvo una fracción en 1000 Da y

aproximadamente 4 fracciones entre 250 y 550 Da. La falta de diferencias entre sitios o fertilizaciones puede ser debido a la baja resolución de la técnica empleada.

### *Proantocianidinas*

En el análisis de los monómeros se encontró que ni Flemingia ni Calliandra cultivados en Matazúl contenían delfinidina. En Flemingia la proporción de cianidina fue de 90% mientras que la proporción de pelargonidina solo fue de 10%. En Calliandra el caso fue parecido, ya que la cianidina representó un 75% y la pelargonidina entre 10-25% de los monómeros medidos. No se encontraron diferencias en las proporciones de monómeros debidos a fertilización.

## CONCLUSIONES

Estos resultados muestran una clara diferencia entre especies de leguminosas en la composición de monómeros y el grado de polimerización o peso molecular de los TC. Además fue evidente que la actividad biológica de los TC medida en términos de astringencia varió entre especies, entre localidades y entre niveles de fertilización dentro de una localidad. Sin embargo, estas diferencias en actividad biológica de los taninos no estuvieron relacionadas con cambios en pesos moleculares.

## LITERATURA CITADA

- Barahona Rosales, R., 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. PhD thesis, Department of Agriculture, The University of Reading, UK.
- Hagerman, A.E., 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *Journal of Chemical Ecology* **13**: 437-449.
- Stewart, J.L., Mould, F., y Mueller-Harvey, I., 2000. The effect of drying treatment on the fodder quality and tannin content of two provenances of *Calliandra calothyrsus* Meissner. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1461-1468.

# Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal

Tassilo T. Tiemann<sup>1</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup>, Gerardo Ramirez<sup>2</sup>,  
Hans Dieter Hess<sup>3</sup> y Carlos E. Lascano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza,  
ttiemann@inw.agrl.ethz.ch

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT),  
Cali, Colombia

<sup>3</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-  
1725 Posieux, Suiza

## INTRODUCCION

La deficiencia de proteínas en la dieta de rumiantes es una de las principales causas de la baja producción ganadera en el trópico. Un objetivo que se persigue en la formulación de sistemas de alimentación es el de asegurar niveles adecuados de amonio en el rumen que permitan una actividad microbiana adecuada. Los taninos presentes en algunas especies de leguminosas tropicales forman fuertes enlaces con proteínas y evitan así su degradación ruminal. Hay reportes que indican que los taninos pueden tener efectos positivos sobre el aprovechamiento de las proteínas y además pueden reducirla emisión de metano en rumiantes. Resultados de ensayos anteriores han mostrado que existen diferencias grandes en las concentraciones de taninos en leguminosas tropicales. Además, no es claro si los taninos presentes en diferentes especies de leguminosa tienen efectos similares en la fermentación ruminal. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de taninos extraídos de leguminosas tropicales sobre parámetros de fermentación in vitro.

## MATERIALES Y METODOS

En este ensayo se empleó la técnica de producción de gas (gas transducer technique, GTT) desarrollada por Theodorou et al. (1994). Un gramo de una mezcla de *Brachiaria humidicola* (CIAT 6133) y *Vigna unguiculata* (Cowpea) (CIAT 391) en relación 2:1 se incubó

sin taninos o con diferentes niveles (25, 50, 75 y 100 mg/g materia seca) de TC purificados, extraídos de cuatro leguminosas arbustivas: *Calliandra calothyrsus* (accesiones CIAT 22310 y 22316) *Flemingia macrophylla* (CIAT 17403) y *Leucaena leucocephala* (CIAT 734). Las hojas de las leguminosas taniníferas fueron cosechadas 9 semanas después de un corte de uniformización y luego congeladas y liofilizadas. Para obtener las muestras de *Brachiaria* y *Vigna* se cosecharon las plantas enteras a ras, antes de la floración y se secaron al sol. Todo el material cosechado se molió a 1 mm en un molino Wiley. De las leguminosas con taninos se extrajeron los taninos según el protocolo de Jones et al. (1976), modificado por Foo and Porter (1981) y Horigome et al. (1988). En resumen la extracción se realizó con acetona acuosa 700 ml/l, con 1 g/l de ácido ascórbico por 75 minutos. Luego la muestra se lavó con dietil éter tres veces y después con etil acetato tres veces. El líquido se evaporó y el residuo se diluyó en 500 ml/l de metanol antes de centrifugar. El sobrenadante se pasó a un beaker con Sephadex LH20 en metanol, se centrifugó por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso hasta que el líquido estuvo claro. Después se adicionaron 700 ml/l de acetona al Sephadex, se centrifugó, se filtró la solución y se liofilizó para obtener taninos secos y cristalinos.

Las muestras de forraje junto con los taninos se incubaron por 168 h utilizando inóculo

extraído de dos novillos fistulados. Durante el proceso de fermentación se midió la presión de gas después de 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 y 168 h. A los residuos sólidos se les analizaron los contenidos de materia seca y nitrógeno y a la fase líquida se le analizaron los contenidos de ácidos grasos volátiles (AGV) y de amonio.

## RESULTADOS

Las curvas de producción de gas mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre tratamientos. Los controles (Brachiaria y Brachiaria más Cowpea) presentaron la tasa más alta ( $P < 0.05$ ) de producción total de gases (281 ml y 264 ml) mientras las tres tasas más bajas se encontraron en los tratamientos con 100 mg de taninos de Calliandra 22310 (165 ml) y 22316 (186 ml) seguido por 75 mg de taninos de Calliandra 22310. Los demás tratamientos formaron un bloque sin diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ). Pero en general se emitieron mayores volúmenes de gas en los tratamientos con baja cantidad de taninos y menores volúmenes en los tratamientos con alta cantidad de taninos. Los tiempos de latencia (lag) fueron más cortos ( $P < 0.05$ ) en Calliandra 22310 que en los controles. Los controles a su vez tuvieron tiempos más cortos que Leucaena y Flemingia ( $P < 0.05$ ). El tiempo de latencia fue más corto ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos con 75 y 100 mg de taninos. Finalmente, se observó que la tasa de producción de gas fue más alta en los controles (Brachiaria y Brachiaria más Cowpea) y se redujo en forma lineal con el aumento en la concentración de taninos.

Se observó que la digestibilidad aparente de la materia seca in vitro (IVDMS) se redujo con cualquier adición de taninos sin importar su origen. Sin embargo, la magnitud de la reducción varió ( $P < 0.05$ ) entre origen de los taninos. La disminución más alta en digestibilidad se observó con taninos de Calliandra 22310, seguida por taninos de Calliandra 22316 y Flemingia. Los taninos de Leucaena mostraron el menor efecto en digestibilidad. La degradación aparente de

proteína cruda (PC) también se afectó ( $P < 0.001$ ) por la adición de taninos. En promedio, la degradación de PC fue de 61% en tratamientos sin taninos, 40-45% con 25 mg de taninos, 20-30% con 50 mg, menos de 18% con 75 mg y menos que 7.5% con 100 mg.

La concentración de los tres mayores AGV en el líquido de fermentación disminuyó ( $P < 0.001$ ) con el aumento de taninos, pero la reducción dependió del origen de los taninos. La concentración de acetato estuvo menos afectada por taninos de Flemingia en comparación con los taninos de las otras leguminosas. Sin embargo, la concentración de propionato fue más alta con taninos de Flemingia y Leucaena que con los de Calliandras. La concentración de butirato aumentó ( $P < 0.05$ ) con los taninos de Flemingia, fue intermedia con taninos de Leucaena y bajó con taninos de las dos Calliandras.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que los taninos condensados de diferentes leguminosas tienen efectos diferentes en los procesos de fermentación ruminal. Los taninos de *Calliandra calothyrsus* tuvieron un efecto más negativo sobre la fermentación ruminal en comparación a los taninos de *Flemingia macrophylla* y *Leucaena leucocephala*. Sin embargo, el efecto negativo de los taninos de *C. calothyrsus* varió entre accesiones. Los taninos de la accesión 22310 redujeron más la degradación de MS y proteína que los taninos de la accesión 22316 lo cual es consistente con lo encontrado en estudios in vivo. Es posible que los efectos diferenciales de los taninos de diferentes especies de leguminosas en fermentación ruminal estén relacionados a su composición química como se discute en otro resumen de estas memorias.

## LITERATURA CITADA

Foo, L.Y. y Porter, L.J., 1981. The structure of tannins of some edible fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **32**: 711-716.

Horigome, T., Kumar, R. y Okamoto, K., 1988. Effects of condensed tannins prepared from the leaves of fodder plants on digestive enzyme in vitro and in the intestine of rats. *British Journal of Nutrition* **60**: 275–285.

Jones, W.T., Broadhurst, R.B. y Lyttleton, J.W., 1976. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry* **15**: 1407-1409.

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllen, A.B. y France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48**: 185-197.

## Efecto de taninos de cuatro leguminosas sobre la digestión in vitro de proteína

Javier Eduardo Cortés<sup>1,3</sup>, Bárbara Moreno<sup>2</sup>, Martha Lucia Pabon<sup>1,2</sup> y Juan E. Carulla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Dep. de Ciencias para la Producción Animal, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, Colombia

<sup>3</sup>[jecortesc@unal.edu.co](mailto:jecortesc@unal.edu.co)

### INTRODUCCION

Los taninos condensados (TC) ligan las proteínas en el rumen protegiéndolas de la degradación microbial, luego el complejo tanino-proteína formado en el rumen se rompe cuando llega al abomaso lo que puede resultar en un aumento de flujo de proteína dietaria al tracto posterior. Sin embargo, el grado de protección de la proteína en el rumen y la estabilidad del complejo tanino-proteína en las condiciones del abomaso parecen estar relacionadas con la estructura del tanino. Esto sugeriría que no todos los taninos tendrían un mismo efecto sobre la proteína dietaria en los rumiantes. Con el objeto de establecer el efecto de diferentes fuentes de TC de leguminosas tropicales sobre la digestibilidad de la proteína in vitro se realizaron tres experimentos uno con taninos purificados y dos con el material completo (hojas).

### MATERIALES Y METODOS

#### Experimento 1

Para determinar el efecto de cuatro fuentes de taninos condensados sobre la degradación in vitro de la proteína se purificaron taninos de las leguminosas *Calliandra calothyrsus* CIAT 22310, *Calliandra calothyrsus* CIAT 22316, *Flemingia macrophylla* CIAT 17403 y *Leucaena leucocephala* CIAT 734 utilizando una columna de Sephadex (Sigma LH-20-100) (Carulla et al., 2001). Se utilizaron cuatro niveles de TC purificados: 0, 30, 60 y 90% (peso a peso) con relación a la proteína de torta de soya incubada. Se utilizó la técnica de digestibilidad in vitro de dos etapas (Tilley y Terry, 1963) modificada en el Laboratorio de

Nutrición Animal (Carulla y Pabón, 2004). Se midió la digestibilidad in vitro de la proteína en la etapa de fermentación por 48 h (DIVPr) y con la adición de pepsina por 24 h adicionales (DIVPtotal). La proteína digerida por la pepsina (DIVPpep) se obtuvo restando la digestibilidad total (48 h de fermentación ruminal + 24 h de digestión con pepsina) de la digestibilidad en la etapa de fermentación ruminal (Ecuación 1).

Ecuación 1:  $\%DIVPC_{pep} = \%DIVPC_{total} - \%DIVPC_r$

#### Experimento 2

Para determinar el efecto de sustituir una leguminosa sin taninos por leguminosas ricas en taninos en una mezcla con una gramínea sobre la digestibilidad in vitro de la proteína se utilizó la misma técnica del Experimento 1, incubando mezclas de *Brachiaria dictyoneura* CIAT 6133 (67%) y el 33% restante una mezcla de leguminosas sin taninos (L) (*Cratylia argentea* CIAT 18668) y taníferas (LT) en cuatro proporciones, así: 33% L, 22% L + 11% LT, 11% L + 22% LT y 33% LT. Las especies de leguminosas taníferas fueron las mismas del Experimento 1.

#### Experimento 3

Usando la misma técnica del Experimento 1, se incubaron las cuatro especies de leguminosas taníferas antes mencionadas en tres niveles de inclusión (0, 25 y 50% de la MS) con *B. dictyoneura* CIAT 6133, con la adición o no de PEG (PM 8000). El PEG se adicionó en relación 1:1 según el contenido de taninos de

cada mezcla, con el fin de aislar el efecto de estos, debido a su mayor afinidad de los taninos al PEG.

## RESULTADOS

### Experimento 1

El aumento en la inclusión de taninos disminuyó la digestibilidad *in vitro* de la proteína de torta de soya en etapa de fermentación ruminal (DIVPr) y la digestibilidad total (DIVPtotal,  $P < 0.05$ ) independientemente de la fuente (Cuadro 1). Sin embargo, la DIVPr de la torta de soya fue menor al adicionar taninos (nivel 90%) de *C. calothyrsus* 22310 (33.4%) o de *F. macrophylla* (34.2%). La disminución de la proteína digerida en el rumen fue parcialmente compensada por un aumento en la proteína digerida por pepsina (DIVPpep) independientemente de la fuente (Cuadro 1). Sin embargo, mientras la DIVPpep de la torta de soya aumentó para la máxima inclusión de taninos de *C. calothyrsus* 22310 y de *C. calothyrsus* 22316, esta disminuyó en el caso de los taninos de *F. macrophylla* y *L. leucocephala* sugiriendo que las fuentes de taninos se comportan diferente en las condiciones ácidas similares a las del abomaso.

El aumento en la porción de proteína digerida en pepsina como consecuencia de la adición de taninos fue muy inferior a la disminución en la digestión a nivel ruminal sugiriendo que todas las fuentes de taninos generan una pérdida neta en la digestión de la proteína. Esta pérdida sería mayor al adicionar taninos de *F. macrophylla* y *L. leucocephala*.

### Experimento 2

El aumento en el nivel de leguminosa taninifera en la mezcla disminuyó la DIVPr para todas las fuentes (Cuadro 2). Para todos los niveles de inclusión, el efecto negativo sobre la DIVPr fue menor para *C. calothyrsus* 22316 y *L. leucocephala* mientras que la inclusión de *C. calothyrsus* 22310 y *F. macrophylla* disminuyó en mayor grado la DIVPr. La DIVPtotal disminuyó poco para los niveles de inclusión de leguminosas taniníferas del 11 y 22% (Cuadro 2), señalando que la disminución en la DIVPr es compensada por un incremento en la DIVPpep para todas las fuentes. Sin embargo, para los niveles de inclusión altos

**Cuadro 1.** Efecto de TC purificados provenientes de leguminosas tropicales sobre el porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la proteína de torta de soya en la etapa de fermentación ruminal (DIVPr) y etapa de fermentación ruminal seguida por digestión con pepsina (DIVPtotal) y el porcentaje de proteína digerida por pepsina (DIVPpep).

Tratamiento	Tanino/Proteína %				Efecto nivel
	0	30	60	90	
	DIVPr				
Control	91.4				
<i>C. calothyrsus</i> 22310	-	68.6a <sup>1</sup>	47.5a	33.4b	<0.0001
<i>C. calothyrsus</i> 22316	-	62.8b	39.5b	38.2ab	<0.0001
<i>F. macrophylla</i>	-	67.0a	40.4b	34.2b	<0.0001
<i>L. leucocephala</i>	-	64.0ab	46.3a	42.1a	<0.0001
	DIVPtotal				
Control	94.7				
<i>C. calothyrsus</i> 22310	-	79.4	56.9	50.2b	<0.0001
<i>C. calothyrsus</i> 22316	-	75.7	53.6	56.0a	<0.0001
<i>F. macrophylla</i>	-	77.1	57.3	42.9c	<0.0001
<i>L. leucocephala</i>	-	72.7	52.5	46.0bc	<0.0001
	DIVPpep				
Control	3.3				
<i>C. calothyrsus</i> 22310	-	10.8	9.4 b	16.8a	0.0055
<i>C. calothyrsus</i> 22316	-	13.0	14.1 a	17.8a	0.0017
<i>F. macrophylla</i>	-	10.1	16.9 a	8.7b	0.0052
<i>L. leucocephala</i>	-	8.7	6.2 c	3.6c	0.41

<sup>1</sup>Para DIVPr, DIVPtotal y DIVPpep las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $P < 0.05$ .

**Cuadro 2.** Efecto de sustituir *C. argentea* por leguminosas taniníferas en una mezcla de 67% *B. dictyoneura* y 33% leguminosa sobre el porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la proteína en la etapa de fermentación ruminal (DIVPr) y etapa de fermentación ruminal seguida por digestión con pepsina (DIVPtotal) y el porcentaje de proteína digerida por pepsina (DIVPpep).

Tratamientos	Nivel de inclusión de leguminosa taninífera, %				Efec. relación
	0	11	22	33	
DIVPr <sup>1</sup>					
<i>C. argentea</i>	88.4				
<i>C. calothyrsus</i> 22310	-	78.7	-	57.6c	0.001
<i>C. calothyrsus</i> 22316	-	78.9	72.7a <sup>2</sup>	67.7b	0.036
<i>F. macrophylla</i>	-	75.2	62.1b	60.5c	0.001
<i>L. leucocephala</i>	-	80.1	73.6a	69.8a	0.001
DIVPtotal					
<i>C. argentea</i>	95.4				
<i>C. calothyrsus</i> 22310	-	93.1	90.0	84.8b	<0.0001
<i>C. calothyrsus</i> 22316	-	92.0	88.4	79.3c	<0.0001
<i>F. macrophylla</i>	-	92.8	86.8	87.0a	<0.0001
<i>L. leucocephala</i>	-	93.0	91.0	90.6a	0.024
DIVPpep <sup>3</sup>					
<i>C. argentea</i>	7.0				
<i>C. calothyrsus</i> 22310	-	14.4	-	27.2a	NS
<i>C. calothyrsus</i> 22316	-	13.1	15.7	11.7c	NS
<i>F. macrophylla</i>	-	17.6	24.7	26.5a	NS
<i>L. leucocephala</i>	-	12.9	17.4	20.8b	NS

<sup>1</sup> Digestibilidad *in vitro* de la proteína corregida por lavado con solución detergente neutro del residuo (Makkar *et al.*, 1995)

<sup>2</sup> Para DIVPr, DIVPtotal y DIVPpep las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $P < 0.05$ .

<sup>3</sup> Diferencia entre la digestibilidad de la proteína en las dos etapas y la digestibilidad de la proteína en etapa de fermentación ruminal.

(33%) la DIVPtotal si disminuyó de manera considerable para las dos accesiones de *C. calothyrsus*.

### Experimento 3

La inclusión de leguminosas taniníferas a (25 o 50%) al *B. dictyoneura* disminuyó la DIVPr

(Cuadro 3). La adición de PEG que posee mayor afinidad por los taninos que las proteínas derivó en un aumento en la DIVPr. Este aumento compensó las pérdidas en la DIVPr por adicionar las dos accesiones de *C. calothyrsus* pero fue insuficiente para compensar las pérdidas en la DIVPr al

**Cuadro 3.** Efecto de taninos condensados de diferentes leguminosas tropicales con o sin adición de PEG, sobre la digestibilidad *in vitro* de la proteína en etapa de fermentación ruminal.

Leguminosa taninífera	% Inclusión de taninífera <sup>1</sup>					
	0		25		50	
	- PEG <sup>2</sup>	+ PEG	- PEG	+ PEG	- PEG	+ PEG
<i>B. dictyoneura</i>	70.2	73.1				
<i>C. calothyrsus</i> 22310			45.1	70.7	40.7	71.0
<i>C. calothyrsus</i> 22316			54.5	67.0	48.1	72.9
<i>F. macrophylla</i>			43.5	56.1	27.4	59.6
<i>L. leucocephala</i>			53.1	58.8	53.6	55.8

<sup>1</sup>Efecto significativo del nivel inclusión de leguminosa,  $P < 0.05$ .

<sup>2</sup>Efecto significativo de la adición de PEG,  $P < 0.05$ .

adicionar *F. macrophylla* o *L. leucocephala*. La *F. macrophylla* presentó los valores mas bajos de DIVPr para los dos niveles de inclusión (25 y 50%) y con o sin la inclusión de PEG (Cuadro 3).

### CONCLUSIONES

Los resultados de los tres experimentos sugieren que los taninos *F. macrophylla* y *C. calothyrsus* 22310 tienen un mayor potencial para reducir la digestibilidad in vitro de la proteína en condiciones similares a las del rumen que los de *C. calothyrsus* 22316 o *L. Leucocephala*. Sin embargo, este mayor potencial es compensado por una mayor digestibilidad en pepsina para *C. calothyrsus* 22310. Por otra parte, el incremento en digestibilidad in vitro de proteína por la adición de PEG fue mayor en mezclas con accesiones de *C. calothyrsus*, sugiriendo que estos taninos son diferentes a los de las otras especies consideradas en este estudio.

### LITERATURA CITADA

- Carulla, J.E., Lascano, C.E. y Klopfenstein, T., 2001. Reduction of tannin level in tropical legume (*Desmodium ovalifolium*) with polyethylene glycol (PEG): effects on intake and N balance, digestion and absorption by sheep. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* **9**: 17-24.
- Carulla, J.E. y Pabón, M.L., 2004. Un sistema in vitro para evaluar los efectos de los taninos en la degradación de la proteína bajo condiciones ruminales y abomasales. En: Hess, H.D. y Gómez, J. (eds.). *Memorias del Taller: Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia*. CIAT. p. 15-19.
- Makkar, H.P.S., Blümmel, M. y Becker, K., 1995. In vitro effects and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **69**: 481-493.
- Tilley, J.M.A y Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* **18**: 104-111.

## Efecto de la adición de taninos condensados de *Leucaena leucocephala* y *Desmodium ovalifolium* sobre las poblaciones de bacterias celulolíticas y parámetros fermentativos durante la degradación in vitro de alfalfa

Claudia P. Sanabria<sup>1,2</sup>, Rolando Barahona<sup>1</sup>, Michael Kreuzer<sup>3</sup>, Diego Alberto Rodríguez<sup>4</sup>, Elizabeth Martín Martínez<sup>1</sup> y Fernando Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Microbiología Molecular, Programa de Fisiología y Nutrición Animal, Corpoica, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, cpsanabria@gmail.com

<sup>3</sup>ETH Zurich, Instituto de Ciencia Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza

<sup>4</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

### INTRODUCCION

La dinámica poblacional del ecosistema ruminal puede verse afectada por muchos factores, siendo uno de los más importantes la composición de la dieta. Así, un alimento rico en fibra puede favorecer el crecimiento de bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*, las que al degradar celulosa en polímeros más simples, como celdodextrinas y generar ácidos grasos volátiles (AGV) y contribuyen al metabolismo energético rumiante. Leguminosas arbóreas y forrajeras incluidas en la dieta de los rumiantes pueden favorecer a las poblaciones celulolíticas por su contenido de fibra. Sin embargo, su contenido de taninos condensados (TC) puede limitar la disponibilidad de proteína y energía a los rumiantes (Barahona, 1999). *Desmodium ovalifolium* y *Leucaena leucocephala* son leguminosas ricas en proteína, pero a su vez presentan altos contenidos de TC (Barahona et al., 2003). En presencia de TC el flujo de proteína al duodeno puede aumentar, pero reducir consumo y/o digestibilidad de materia orgánica. Estudios realizados por Carulla et al. (2001) mostraron aumentos en el flujo de proteína al duodeno en la presencia de diferentes concentraciones de TC de *D. ovalifolium*, aunque la eficiencia de absorción (g de N absorbido/g de N que alcanzaron el duodeno) fue similar entre tratamientos.

Sin embargo, Waghorn et al. (1987) no reportaron aumentos en la degradabilidad aparente de N en presencia de TC. Estas

diferencias entre estudios, podrían estar asociadas a características de los TC como su tamaño y su composición monomérica (Barahona, 1999). De otro lado, es posible que los taninos depriman algunas especies bacteriales del rumen e inhiban algunas enzimas (McSweeney et al., 2001). El presente estudio se llevó a cabo para evaluar el efecto in vitro de TC sobre el ecosistema ruminal y particularmente sobre poblaciones de bacterias celulolíticas predominantes (*R. flavefaciens* y *F. succinogenes*) y parámetros de la fermentación.

### MATERIALES Y METODOS

Para realizar el estudio se purificaron TC de las leguminosas *D. ovalifolium* y *L. leucocephala* usando una modificación propuesta por Barahona et al. (2003) al protocolo de Terrill et al. (1992). Los efectos de los TC purificados se evaluaron en un periodo máximo de 24 horas de fermentación in vitro. Las fermentaciones se realizaron anaeróticamente en botellas de 50 ml siguiendo los protocolos de Bryant y Burkey (1953) y Hungate (1970) en un cuarto caliente a 39°C. Cada botella contenía 10 ml de solución buffer compuesta de 20% de fluido ruminal y 80% de medio A (Bryant y Burkey, 1953) y 100 mg de alfalfa molida como substrato, en los tratamientos, se agregaron 10 mg del TC a evaluar.

Para evaluar efectos de TC en fermentación se realizaron ensayos de producción de gas usando un transductor de

presión manual (TPM) y siguiendo la técnica de Theodorou et al. (1994). La degradabilidad del substrato se calculó por el método gravimétrico de pérdida de fibra en detergente neutro (FDN). Para la determinación de AGV en las fermentaciones se utilizó un cromatógrafo de gas AutoSystem XL Perkin Elmer adaptado con un detector de ionización de llama y una columna de capilaridad Perkin Elmer FFAP (longitud: 30 m, diámetro: 0.32mm, membrana: 0.25  $\mu$ m), el gas transportador fue nitrógeno, las temperaturas de detección e inyección fueron 200°C y 180°C, respectivamente. Los datos se manejaron con un programa Turbochrom-PE NELSON. Finalmente, para monitorear las poblaciones de bacterias se utilizó la técnica de PCR-TR con el programa de amplificación sugerido por la IAEA (2004). Para cada muestra se utilizaron los primers específicos para *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* (blanco), y primers referencia (bacterias totales). En PCR-TR el Ct (*cycle threshold*) es el dato reportado por el equipo para cada población monitoreada, la cuantificación de las poblaciones blanco se realizó de manera relativa en los tratamientos con respecto al control usando el índice  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (donde  $\Delta Ct = Ct \text{ blanco} - Ct \text{ referencia}$  y  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tratamiento} - \Delta Ct \text{ control}$ ), analizando los datos según lo propuesto por Denman y McSweeney (2005).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Producción de gas

La adición de TC redujo ( $P < 0.05$ ) la producción máxima de gas con respecto al control, siendo el

efecto más notable con TC de *D. ovalifolium* (Cuadro 1).

El tratamiento con TC de *L. leucocephala* produjo más ( $P < 0.05$ ) gas que el tratamiento con TC de *D. ovalifolium*, lo cual está de acuerdo a lo reportado por Barahona et al. (2003). El tiempo de adaptación (lag) de bacterias al substrato fue más rápido ( $P < 0.05$ ) en el control y con TC de *L. leucocephala* que con TC de *D. ovalifolium*. Sin embargo, aunque los TC de *D. ovalifolium* parecen hacer más rápida la producción de gas en los primeros estadios de la fermentación, limitan la producción total de gas al final de la incubación.

### Degradabilidad del substrato

En todas las horas de fermentación se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con inclusión de TC purificados y el control, siendo en todos los casos superior la degradabilidad con TC de *L. leucocephala* que con los de *D. ovalifolium* (datos no mostrados). Esto coincide con lo reportado por Barahona et al. (2003), donde *L. leucocephala* tuvo mayor degradabilidad que *D. ovalifolium*. En todas las horas de fermentación que se evaluaron, el control tuvo una degradabilidad más alta ( $P < 0.05$ ) que los tratamientos con TC. Se encontró una correlación entre la degradabilidad y la producción de gas por tratamiento ( $r > 0.97$ ).

### Producción de ácidos grasos volátiles

Los TC de *D. ovalifolium* parecieron favorecer la fermentación ruminal durante la etapa inicial de

**Cuadro 1.** Parámetros del modelo matemático exponencial doble de Gompertz en la cuantificación de la producción de gas *in vitro* con TC purificados de *D. ovalifolium* y *L. leucocephala*.

Tratamiento	Parámetros						
	a <sup>1</sup>	b	C	HPI	GPI	TMPG	FL
Control	163.81a <sup>2</sup>	1.13b	0.173b	6.52a	60.26a	10.45b	0.737b
Leucaena	161.53b	1.14b	0.185b	6.23b	59.42b	10.98b	0.788b
Desmodium	138.54c	1.32a	0.254a	5.21c	50.96c	12.99a	1.285a

<sup>1</sup> a, producción máxima de gas (ml); b, tasa de crecimiento ascendente (ml/h); c, tasa de crecimiento descendente (ml/h); HPI, hora al punto de inflexión; GPI, ml de gas al punto de inflexión; TMPG, tasa máxima de producción de gas (ml/h); FL, fase lag (tiempo de adaptación del microorganismo en horas).

<sup>2</sup> Letras diferentes en la columna significan medias con diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

incubación, ya que con su adición se observó una mayor producción de AGV totales (Cuadro 2). Sin embargo, al final de la fermentación hubo una mayor producción de AGV totales en el tratamiento con TC de *L. leucocephala*. En el transcurso de la fermentación se aumentó como era de esperarse la producción de AGV con todos los tratamientos (Cuadro 2). La proporción acético:propiónico en las horas 12 y 24 de fermentación fue inferior con TC de *D. ovalifolium* (Cuadro 2), lo que sugiere que a pesar de su menor producción total de AGV, con este tratamiento se optimizó el uso de energía, pues al aumentar la síntesis de propionato, disminuye la producción de metano (Pabón, 2004). Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Barahona et al. (2003), quienes reportaron concentraciones más altas de AGV en presencia de taninos de *L. leucocephala* que de *D. ovalifolium*.

#### Monitoreo de la Dinámica Poblacional Microbiana por PCR-TR

Las poblaciones de *F. succinogenes* se redujeron en relación con el control en presencia de TC, aunque esta reducción fue significativamente mayor con *D. ovalifolium* (Cuadro 3), lo que puede significar una mayor susceptibilidad de esta especie bacteria en el rumen a los TC evaluados en este ensayo.

Por otro lado, las poblaciones de *R. flavefaciens* aumentaron ( $P<0.05$ ), en los tratamientos donde

se adicionó TC de las dos leguminosas evaluadas. Sin embargo, este incremento fue más notable en la hora 24 con la adición de TC de *D. ovalifolium*. Es posible que en presencia de taninos algunas bacterias tengan cambios en morfología que incluyan la tendencia de crecer en cadenas, la formación de protoplastos, la presencia de grandes cantidades de material superficial, la floculación de los cultivos y la elongación de las células bacteriales (Nelson et al., 1995).

En general, estos resultados sugieren que en la presencia de TC se presentan cambios en la composición de la flora ruminal, existiendo especies que son susceptibles a la presencia de taninos y otras (aparentemente *R. flavefaciens* en este caso) con respuestas adaptativas que les permiten sobrevivir a esas concentraciones.

#### CONCLUSIONES

Los TC de dos leguminosas evaluadas tuvieron diferentes efectos sobre los parámetros de fermentación, teniendo los TC de *L. Leucocephala* menor impacto en la dinámica de las bacterias evaluadas a juzgar por la producción de gas, AGV, y biomasa de *F. succinogenes* en comparación con los TC de *D. ovalifolium*. Se demostró además que diferentes TC tienen efectos distintos sobre las poblaciones ruminales, aún cuando estén en las mismas concentraciones, corroborando las observaciones de otras investigaciones. El uso

**Cuadro 2.** Concentración de AGV en  $\mu\text{mol}$  observada durante la fermentación ruminal *in vitro* de alfalfa adicionando TC purificados de *D. ovalifolium* y *L. Leucocephala*.

Tiempo (h)	Tratamiento	Acidos grasos volátiles					Total	A:P <sup>1</sup>
		Acético	Propiónico	Butírico	Isobutírico			
1	Control	16.08c <sup>2</sup>	6.91 <sup>a</sup>	3.38a	0.33a	26.70b	2.33c	
	<i>Leucaena</i>	20.37a	6.63b	2.47b	0.17b	29.64a	3.07b	
	<i>Desmodium</i>	17.29b	4.61c	1.98c	0.21b	24.09c	3.76a	
12	Control	23.50c	9.74b	4.24b	0.89a	38.36b	2.42c	
	<i>Leucaena</i>	26.06b	6.84c	4.38b	0.34c	37.62c	3.81a	
	<i>Desmodium</i>	30.76a	10.57 <sup>a</sup>	6.93a	0.52b	48.78a	2.91b	
24	Control	39.57a	13.11 <sup>a</sup>	6.41b	1.07a	60.17a	3.02c	
	<i>Leucaena</i>	39.67a	10.29b	5.65c	1.08a	56.70b	3.85a	
	<i>Desmodium</i>	33.88b	10.4b	7.40a	1.09a	52.78c	3.26b	

<sup>1</sup>Proporción acético:propiónico.

<sup>2</sup>Letras diferentes en la columna por hora indican medias con diferencia significativa,  $P<0.05$ .

**Cuadro 3.** Relación de las poblaciones de las bacterias celulolíticas ruminales *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* en los tratamientos con respecto al control, por medio del índice  $2^{-2.97Ct}$ , para las fermentaciones de contenido ruminal *in vitro* de alfalfa adicionando TC purificados de *D. ovalifolium* y *L. Leucocephala*.

Tiempo (h)	Tratamiento	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. flavefaciens</i>
0	Control	1.000a <sup>1</sup>	1.00b
	<i>Leucaena leucocephala</i>	0.519b	2.64a
	<i>Desmodium ovalifolium</i>	0.298c	2.61a
12	Control	1.000a	1.00a
	<i>Leucaena leucocephala</i>	0.595b	4.67b
	<i>Desmodium ovalifolium</i>	0.221c	4.53b
24	Control	1.000a	1.00c
	<i>Leucaena leucocephala</i>	0.266b	3.08b
	<i>Desmodium ovalifolium</i>	0.054c	32.76 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes en la columna por hora indican medias con diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

de la técnica de PCR-TR permitió demostrar que las susceptibilidades de los grupos bacteriales a la presencia de metabolitos secundarios son específicas para cada grupo, observándose que en la presencia de TC algunos grupos aumentan y otros disminuyen sus densidades poblacionales. Es posible que los aumentos estén asociados a que al eliminarse algunas poblaciones, se disminuya la competencia entre las poblaciones restantes, favoreciendo su crecimiento.

#### LITERATURA CITADA

- Barahona, R. 1999. *Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships*. Ph.D. Thesis, Department of Agriculture, The University of Reading. 353 pp.
- Barahona, R., Lascano, C., Narvaez, N., Owen, E., Morris, F. y Theodorou, M., 2003. In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharidae content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 1256-1266.
- Bryant, M.P. y Burkey, L.A., 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science* **36**: 205-217.
- Carulla, J., Lascano, C. y Klopfenstein, T., 2001. Reduction of tannin level in a tropical legume (*Desmodium ovalifolium*) with polyethylene glycol (PEG): effects on intake and N balance, digestion and absorption by sheep. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* **9**: 17-24.
- Denman, A.E. y McSweeney, C.S., 2005. Quantitative (real time) PCR. En: Makkar, H. y McSweeney, C. (eds.), *Methods in gut microbial ecology for ecology for ruminants*. Springer, IAEA, FAO.
- Hungate, R.E., 1970. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Norris, J. R. y Robbins, D. V. (eds.). *Methods in Microbiology*. London, Academic Press, Vol. **38**: 117-132.
- IAEA, 2004. *qPCR workshop for rumen microbial ecology*. Brisbane, Australia.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R. y Krause, D.O., 2001. Effect of the tropical forage Calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 78-88.
- Nelson, K.E., Pell, A.N., Schofield, P. y Zinder, S., 1995. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolyzable tannins. *Applied and Environmental Biology* **61**: 3293-3298.

- Pabón, M.L., 2004. *Bioquímica Ruminal*. Universidad nacional de Colombia, Unibiblos, Bogotá, Colombia.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B. y Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrated meals and cereal grains. *Journal of Science Food and Agriculture* **58**: 321-329.
- Theodorou, M., Williams, B., Dhanoa, M., McAllan, A., y France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48**: 185-197.
- Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., John, A. y Fisher, M.T., 1987. The effect of condensed tannins on site digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*. *British Journal of Nutrition* **57**: 115-126.

# Dinámica de fermentación ruminal de mezclas de leguminosas con contenidos y tipos de taninos contrastantes

Hans Dieter Hess<sup>1</sup>, Christoph Dominic Stürm<sup>2</sup> y Tassilo T. Tiemann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-1725 Posieux, Suiza, [dieter.hess@alp.admin.ch](mailto:dieter.hess@alp.admin.ch)

<sup>2</sup>ETH Zurich, Instituto de Ciencia Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza

## INTRODUCCION

Rumiantes juegan un papel importante como fuente de ingreso y de proteína de alta calidad para las poblaciones rurales en países en vía de desarrollo. A menudo la productividad de rumiantes en el trópico es baja debido a una inadecuada e insuficiente alimentación basada en forrajes y residuos de cosecha que presentan contenidos bajos de proteína. El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ha identificado una serie de especies de leguminosas arbustivas con gran potencial agronómico que podrían servir como suplemento forrajero para rumiantes alimentados con gramíneas tropicales de baja calidad y contribuir a resolver este problema. Muchas de estas leguminosas contienen taninos. Taninos pueden tener tanto efectos positivos como efectos negativos sobre la eficiencia de conversión alimenticia y la utilización de proteína. Estudios previos mostraron que la incorporación de leguminosas ricas en taninos (e.g. *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla*) como único suplemento no siempre mejora el valor nutricional de la dieta completa (Hess et al., 2003; Mera Álvarez, 2004). Sin embargo en combinación con leguminosas sin taninos (e.g. *Vigna unguiculata*) estas leguminosas ricas en taninos podrían contribuir a mejorar la nutrición de rumiantes en el trópico.

Existe poca información sobre la dinámica de fermentación ruminal y los efectos de taninos en mezclas de leguminosas cuando se utilizan como suplemento en una dieta basada en gramíneas de baja calidad. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de

mezclas contrastantes de leguminosas con y sin taninos, una gramínea tropical de bajo valor nutricional sobre la dinámica de la fermentación ruminal y la degradación de proteína.

## MATERIALES Y METODOS

El follaje de las cuatro especies arbustivas (*Cratylia argentea* CIAT 18516, *C. calothyrsus* CIAT 22316, *F. macrophylla* CIAT 17403 y *Leucaena leucocephala* CIAT 734) fue cosechado manualmente 8 semanas después del último corte y liofilizado. El material de la gramínea (*Brachiaria humidicola*) fue cosechado después de un tiempo de rebrote de 12 semanas y secado al sol. En el caso de *V. unguiculata* el forraje fue cosechado 8 semanas después del establecimiento y también fue secado al sol. En el Experimento 1, *B. humidicola*, *V. unguiculata* y *C. calothyrsus* fueron evaluados solas o en diferentes mezclas. Las dietas suplementadas contenían 1/3 o 2/3 de leguminosa y el suplemento consistía de *V. unguiculata*, *C. calothyrsus* o de mezclas de las dos especies (4:1, 3:2, 2:3 o 1:4). En el Experimento 2, *B. humidicola* fue evaluado solo o en combinación con leguminosas (1/3 de la dieta). El suplemento consistía de una leguminosa sola (*V. unguiculata*, *C. argentea*, *C. calothyrsus*, *F. macrophylla* o *L. leucocephala*) o de una mezcla de *V. unguiculata* con una de las cuatro leguminosas arbustivas en proporciones de 1:2 o 2:1. En total se evaluaron 15 dietas en el experimento 1 y 14 dietas en el experimento 2. En ambos experimentos todas las dietas se evaluaron con y sin la adición de polietileno glicol (PEG, 35 g/kg de materia seca). Los

experimentos se realizaron empleando un sistema de fermentación *in vitro* (gas pressure transducer technique) desarrollado por Theodorou *et al.* (1994).

## RESULTADOS

### Experimento 1

La degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) más alta ( $P < 0.05$ ) se observó en la dieta *B. humidicola* sola y en las dietas suplementadas con altas proporciones de *V. unguiculata*. Las mezclas con altas proporciones de *C. calothyrsus* y la dieta de *C. calothyrsus* sola presentaron la DIVMS más baja ( $P < 0.05$ ). La DIVMS decreció linealmente ( $P < 0.001$ ) cuando se incrementó la proporción de *C. calothyrsus* en la mezcla. Esta reducción en la DIVMS fue mucho menor cuando se adicionó PEG a las dietas. Esto resultó en una interacción altamente significativa ( $P < 0.001$ ) entre la adición de PEG y el tipo de dieta. El efecto del PEG fue mucho mayor en dietas con altas proporciones de *C. calothyrsus* que en las dietas con bajas proporciones o sin esta leguminosa. Las tasas de producción de gas más altas se observaron con la dieta de solo *V. unguiculata* y las tasas más bajas con la dieta de solo *C. calothyrsus* y con las dietas con alta proporción de esta leguminosa ( $P < 0.05$ ). Con las demás mezclas y con *B. humidicola* sola se observaron valores intermedios. La interacción entre la adición de PEG y el tipo de dieta fue altamente significativa ( $P < 0.001$ ) y el aumento en la tasa de producción de gas debido a la adición de PEG fue mucho más grande con las dietas con altas proporciones de *C. calothyrsus* que con las otras dietas. La mayor cantidad de proteína cruda (PC) degradada se observó con *V. unguiculata* sola y la menor cantidad con *B. humidicola* sola ( $P < 0.05$ ). La adición de PEG aumentó ( $P < 0.05$ ) la cantidad de PC aparentemente degradada en la dieta de *C. calothyrsus* sola y en las mezclas con altas proporciones de esta leguminosa pero no tuvo efecto en las demás dietas (interacción:  $P < 0.001$ ). Además se observó que la cantidad de PC degradada no varió mucho cuando se incluyeron proporciones pequeñas de

*C. calothyrsus* en la dieta. Pero con proporciones más grandes ( $> 130$  g/kg) la cantidad de PC degradada disminuyó drásticamente.

### Experimento 2

La DIVMS más alta ( $P < 0.05$ ) se observó con la dieta de *B. humidicola* sola y las mezclas con *V. unguiculata* y *C. argentea*. El reemplazo parcial o completo de *V. unguiculata* por *C. argentea* no afectó ( $P > 0.05$ ) la DIVMS pero con todas las demás leguminosas arbustivas la DIVMS se disminuyó. La DIVMS más baja ( $P < 0.05$ ) presentó la mezcla que consistió de 1/3 de *F. macrophylla*. La interacción entre la adición de PEG y el tipo de dieta fue altamente significativa ( $P < 0.001$ ) y la adición de PEG aumentó la DIVMS de dietas con altas proporciones de leguminosas con taninos pero no tuvo efecto en las demás dietas. Las mezclas de *B. humidicola* con *V. unguiculata* y *C. argentea* presentaron las más altas tasas de producción de gas ( $P < 0.05$ ). Las tasas más bajas ( $P < 0.05$ ) se observaron con la dieta de *B. humidicola* sola y las mezclas con 1/3 de *F. macrophylla* o *C. calothyrsus*. El reemplazo parcial o completo de *V. unguiculata* por *C. argentea* no afectó ( $P > 0.05$ ) la tasa de producción de gas. Pero con cualquier otra leguminosa arbustiva la tasa se disminuyó a medida que aumentó la proporción en la mezcla. La cantidad más alta de PC degradada se observó en las mezclas con *C. argentea* y la más baja en la dieta de *B. humidicola* sola ( $P < 0.05$ ). Las mezclas con *L. leucocephala* presentaron valores intermedios. Las mezclas con *C. calothyrsus* o *F. macrophylla* presentaron los valores más bajos de todas las dietas suplementadas con leguminosas. Cuando el suplemento consistió de *C. calothyrsus* o *F. macrophylla* sola, la cantidad de PC degradada fue similar ( $P > 0.05$ ) a la cantidad observada en la dieta de *B. humidicola* sola. La cantidad de PC degradada decreció ( $P < 0.05$ ) a medida que incrementó la proporción de leguminosas taniníferas en la dieta cuando no se adicionó PEG. Con PEG este efecto no se observó (interacción:  $P < 0.001$ ).

## DISCUSION

En general, este estudio mostró que el heno de *B. humidicola* presenta una alta degradabilidad *in vitro* de la materia seca (MS) (>650 g/kg) pero un contenido extremadamente bajo de PC (<50 g/kg). Por lo tanto esta gramínea podría representar una buena fuente de energía fermentable si está adecuadamente suplementada con una fuente de proteína degradable. La leguminosa *V. unguiculata* es valiosa como suplemento proteico para rumiantes alimentados con este tipo de gramíneas porque su inclusión en la dieta incrementa el suministro de proteína degradable sin disminuir la degradación de MS. El efecto de la sustitución de *V. unguiculata* por los diferentes forrajes arbustivos dependió fuertemente del contenido de taninos. La sustitución por *C. argentea*, que no tiene taninos, no tuvo mayores efectos en los parámetros de fermentación y la degradación ruminal de PC comparado con la dieta suplementada con *V. unguiculata* sola.

La suplementación con *C. calothyrsus* o *F. macrophylla*, que tienen altos niveles de taninos, no aumentó la cantidad de PC degradada comparado con la dieta de *B. humidicola* sola y disminuyó la digestibilidad de MS. Sin embargo, en combinación con *V. unguiculata* fue posible incluir hasta 130 g/kg MS de *C. calothyrsus* o *F. macrophylla* en la dieta sin efectos negativos sobre la fermentación ruminal. En el caso de *L. leucocephala* está proporción máxima parece estar alrededor de 220 g/kg MS de la dieta total.

Si se incluyen proporciones mayores de leguminosas ricas en taninos, la degradación de PC se disminuye drásticamente. Es posible que esta disminución resulte en un incremento en el flujo de proteína "bypass" en rumiantes alimentados con este tipo de mezclas. Sin

embargo como el presente estudió solamente consideró los procesos de fermentación ruminal, los efectos sobre la digestión y utilización de PC en el tracto digestivo posterior, se deben evaluar en ensayos de alimentación con animales.

## CONCLUSION

La inclusión de leguminosas arbustivas con altos niveles de taninos como suplemento de gramíneas con bajo nivel de proteína no aportó proteína degradable y disminuyó la digestibilidad de la materia seca. Sin embargo, la mezcla de leguminosas arbustivas con y sin taninos en ciertos niveles redujo los efectos negativos de los taninos. En todas las dietas con altos niveles de leguminosas ricas en taninos la adición de PEG aumentó la digestibilidad *in vitro* de MS y la cantidad de proteína degradada. Esto indica que los taninos son la causa principal de los bajos valores nutricionales de estas plantas.

## LITERATURA CITADA

- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, Díaz, T.E. y Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 703-713.
- Mera Álvarez, M.L., 2004. *Efecto de leguminosas forrajeras tropicales ricas en taninos sobre la fermentación ruminal y la producción de metano en un sistema in vitro (RUSITEC)*. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllen, A.B. y France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48**: 185-197.

## **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**

Claudia P. Sanabria<sup>1,2</sup>, Rolando Barahona<sup>1</sup>, Tassilo T. Tiemann<sup>3</sup>, Carlos E. Lascano<sup>4</sup>, Elizabeth Martín Martínez<sup>1</sup> y Fernando Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Microbiología Molecular, Programa de Fisiología y Nutrición Animal, Corpoica, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, cpsanabria@gmail.com

<sup>3</sup>ETH Zurich, Instituto de Ciencia Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza

<sup>4</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia

### **INTRODUCCION**

En muchas regiones tropicales se usan mezclas de hojas de árboles forrajeros como un suplemento o como la ración entera de animales domésticos (Coates, 1995), especialmente con pequeños rumiantes (Gill y Powell; 1993). Para Devendra y Pun (1990), la racionalidad de usar mezclas de forrajes se basa en la posibilidad de reducir los efectos tóxicos ligados a un forraje en particular y en el incremento de la palatabilidad de la dieta. Otro beneficio potencial del uso de mezclas de plantas forrajeras, se obtendría al mezclar forrajes con niveles variables de taninos condensados (TC) y con proteínas de diferente potencial de degradación para mejorar de esa forma la utilización del nitrógeno por rumiantes al reducir pérdidas como amonio en el proceso de digestión en el rumen (Lascano y Palacios, 1993). Para seleccionar leguminosas tropicales con TC que interactúen positivamente en el proceso de fermentación en el rumen y diseñar sistemas de alimentación basados en mezclas, es necesario comprender como éstos y otros polifenoles afectan el consumo, la dinámica ruminal, la digestibilidad y la utilización del nitrógeno por los rumiantes. Este conocimiento y la consecuente manipulación de la microbiota ruminal, podría permitir manipular la dieta de rumiantes para optimizar parámetros de fermentación (Martín et al., 2003). Con el fin de contribuir a nuestro conocimiento sobre la utilidad de usar mezclas de leguminosas con y sin taninos, se condujo un experimento para

evaluar el efecto sobre grupos microbianos en el rumen debido a la suplementación de una dieta de baja calidad nutricional con mezclas de leguminosas taniníferas y no taniníferas.

### **MATERIALES Y METODOS**

El efecto de mezclas de forrajes sobre parámetros de fermentación se evaluó en un periodo máximo de 24 horas de incubación in vitro. El líquido ruminal fue colectado de dos toros Holstein con fistula ruminal en pastoreo de pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*). Las fermentaciones fueron realizadas anaeróbicamente en botellas de 150 ml de capacidad siguiendo los protocolos de Theodorou et al. (1994). En cada botella se incluyó un gramo de materia seca (MS) del forraje, las botellas se llenaron hasta 85 ml con la mezcla de minerales y solución buffer y 4 ml del agente reductor. Cada botella fue inoculada con 10 ml de fluido ruminal e incubada en un baño de maría a 39°C. Los tratamientos consistieron de 100% heno de *Brachiaria humidicola* (tratamiento control) y mezclas de 33% de heno de *B. humidicola* con 67% de heno de *Vigna unguiculata* (Caupi), *Flemingia macrophylla* o *Calliandra calothyrsus*. Los ensayos de producción de gas se realizaron usando un transductor de presión manual (TPM) y siguiendo la técnica de Theodorou et al. (1994). Los resultados de la prueba de gas se ajustaron con el modelo matemático de regresión exponencial propuesto por Gompertz. Para la determinación de los ácidos grasos

volátiles (AGV) producto de la fermentación se utilizó un cromatógrafo de gas AutoSystem XL Perkin Elmer adaptado con un detector de ionización de llama y una columna de capilaridad Perkin Elmer FFAP, el gas transportador fue N. La concentración de amonio en el fluido de la fermentación se determinó según McCullough (1967).

Finalmente, para monitorear las poblaciones de microorganismos ruminales se utilizó la técnica de PCR-TR con el programa de amplificación sugerido por la IAEA (2004). Para cada muestra se utilizaron primers definidos para *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, metanogénicas, hongos (blanco), y primers referencia (bacterias totales). En PCR-TR el Ct (cycle threshold) es el dato reportado por el equipo para cada población monitoreada. La cuantificación de las poblaciones blanco se realizó de manera relativa en los tratamientos con respecto al control usando el índice  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (donde  $\Delta Ct = Ct \text{ blanco} - Ct \text{ referencia}$  y  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tratamiento} - \Delta Ct \text{ control}$ ), analizando los datos según lo propuesto por Denman y McSweeney (2005).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Producción de gas

La adición de leguminosa no taninífera (Caupí) aumentó la producción de gas en cerca del 16% con respecto al control, mientras que la adición de Calliandra o Flemingia redujo la producción de gas al 80 % y 78% de la observada con el control, respectivamente. Los tratamientos con Caupí o Flemingia mostraron la menor ( $P < 0.05$ ) hora al punto de inflexión, las que fueron 4.8 y

3.9 h más temprano que lo observado con el tratamiento control, respectivamente. A pesar de su alto contenido de TC, parece existir en Flemingia una fracción de nutrientes altamente disponible tal como lo sugiere un menor tiempo transcurrido para el inicio de la fermentación (lag) estimado con el modelo Gompertz (Cuadro 1).

En todos los tratamientos, la adición de leguminosas redujo la fase lag comparada con el control, lo que sugiere un menor tiempo de adaptación de los microorganismos a los substratos e implica un mejor aprovechamiento de los nutrientes desde las etapas tempranas de la fermentación. Al final de la fermentación la producción de gas con leguminosas taniníferas se redujo significativamente, lo cual no se observó con los substratos no taniníferos. Estos resultados son congruentes con los de Barahona et al. (2003), quienes encontraron que con leguminosas con altos niveles de TC (e.g. *C. calothyrsus* y *F. macrophylla*) hubo una menor producción de gas.

### Producción de AGV

La inclusión de Caupí (leguminosa sin taninos) resultó en un aumento en la concentración de AGV en comparación a los demás tratamientos. La adición de Caupí resultó en 1.1 veces más producción de ácido acético y 1.12 veces más producción de AGV totales con respecto al control (Cuadro 2). Además la inclusión de Caupí presentó la mayor producción de ácido propiónico lo que sugiere una alta cantidad de substratos fácilmente disponibles con esta

**Cuadro 1.** Parámetros del modelo matemático exponencial doble de Gompertz para la producción de gas *in vitro* con 33% de inclusión de leguminosas en base a MS.

Tratamiento	Parámetros <sup>1</sup>						
	a	b	c	HPI	GPI	TMPG	FL
Control	119.4ab	1.85a	0.1021ab	18.3a	43.9ab	4.43b	8.41a
Calliandra	96.1b	1.47b	0.0780c	18.7a	35.3b	2.78c	5.98b
Caupí	138.2a	1.58b	0.1174a	13.5b	50.8a	5.93a	4.97bc
Flemingia	92.7b	1.38b	0.0950b	14.5b	34.1b	3.26c	4.01c

<sup>1</sup>a, producción máxima de gas (ml); b, tasa de crecimiento ascendente (ml/h); c, tasa de crecimiento descendente (ml/h); HPI, hora al punto de inflexión; GPI, ml de gas al punto de inflexión; TMPG, tasa máxima de producción de gas (ml/h); FL, fase lag: tiempo de adaptación del microorganismo en horas.

<sup>2</sup>Letras diferentes en la columna indican medias con diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

**Cuadro 2.** Concentración de AGV (mM) observada al final de la fermentación ruminal *in vitro* de un heno de *Brachiaria humidicola* sin (control) o con 33% de inclusión de MS de leguminosas.

Tratamiento	Acidos grasos volátiles					Ace:Pro*
	Acético	Propiónico	Butírico	Isobutírico	Total	
Control	27.5b	6.9b	2.2b	0.23b	36.9b	3.99a
Calliandra	17.9c	6.8b	2.1b	0.24b	27.1c	2.66c
Caupí	29.2a	9.0a	3.1a	0.34a	41.6a	3.26b
Flemingia	26.6b	7.7b	1.3c	0.27b	35.9b	3.46ab

<sup>1</sup>Proporción acético:propiónico.

<sup>2</sup>Letras diferentes en la columna indican medias con diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

leguminosa (Ferrell, 1988). Entre las leguminosas taniníferas evaluadas fue evidente que Flemingia tuvo una fracción más fácilmente disponible para los microorganismos que Calliandra dada la mayor producción de propionato observada con la primera leguminosa.

La producción total de AGV observada a la hora 24 estuvo relacionada con la producción de gas, ( $R = 0.83$ ,  $P < 0.05$ ). Aunque para todos los AGV el coeficiente de correlación fue  $\geq 0.69$ , la contribución del ácido propiónico a esta relación fue más marcada ( $R = 0.79$ ,  $P < 0.05$ ). Esta observación es consistente con lo reportado por Doane et al. (1997) en fermentaciones *in vitro*, donde estos dos parámetros estuvieron directamente inter-relacionados.

#### *Producción de amonio*

Como era de esperarse, la inclusión de las leguminosas estuvo asociada con un aumento en la producción de amonio al final de la incubación (datos no mostrados), lo cual se explica por el mayor contenido de proteína de las leguminosas con respecto al heno de *B. humidicola* (Barahona, 1999).

#### *Dinámica poblacional microbiana*

Con la inclusión de leguminosas hubo un aumento en las poblaciones microbianas al final de la fermentación, aumento que fue más notable con las leguminosas taniníferas (Cuadro 3). Esto parece confirmar resultados de otros estudios que indican que en la presencia de ciertos taninos las poblaciones de hongos

**Cuadro 3.** Relación de las principales poblaciones de microorganismos ruminales en los tratamientos con respecto al control, por medio del índice  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , para las fermentaciones de contenido ruminal *in vitro* de un heno de *Brachiaria humidicola* sin (control) o con 33% de inclusión de MS de leguminosas.

Tiempo (h)	Tratamiento	Hongos	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. flavefaciens</i>	Metanogénicas
0	Control	1.00a <sup>1</sup>	1.00a	1.00	1.00a
	Calliandra	0.31c	0.50b	0.98	1.20a
	Caupí	0.40b	0.39b	0.97	0.56b
	Flemingia	0.30c	1.01a	0.52	0.34b
12	Control	1.00c	1.00a	1.00a	1.00
	Calliandra	2.04b	0.82b	0.45b	0.50
	Caupí	0.51d	0.36c	0.22c	1.01
	Flemingia	3.15a	0.14c	0.05d	0.91
24	Control	1.00c	1.00d	1.00a	1.00a
	Calliandra	10.41a	3.82b	0.90a	1.10a
	Caupí	1.80b	5.08a	0.86a	0.71b
	Flemingia	11.60a	1.96c	0.13b	0.00c

<sup>1</sup>Letras diferentes en la columna por hora indican medias con diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

anaeróbicos logran crear microambientes favorables para su crecimiento (McAllister et al., 1994).

En el caso de las bacterias celulolíticas, se observaron respuestas diferentes en las dos especies evaluadas a la inclusión de leguminosas con TC. Mientras hacia la hora 24, *F. succinogenes* aumentó en todos los tratamientos con respecto al control, principalmente con Caupí y en menor grado con Flemingia, las poblaciones de *R. flavefaciens* disminuyeron con respecto al control, siendo la disminución más notable con Flemingia (Cuadro 3). Estos resultados sugieren que Flemingia posee características que limitan el crecimiento de las bacterias celulolíticas, en comparación con otras leguminosas con taninos. Por otra parte, hacia la hora 24, los niveles poblacionales de las metanogénicas disminuyeron con respecto al control, siendo más notorio este efecto con Flemingia. Es probable que las diferencias observadas entre las leguminosas taniníferas se deban a diferencias entre taninos, en respuesta a diferente composición monomérica y peso molecular de los TC (Barahona, 1999).

## CONCLUSIONES

En este experimento la inclusión de leguminosas taniníferas en mezcla con leguminosas sin taninos resultó en una disminución en la producción de gas. La inclusión de Calliandra en las mezclas resultó en menor concentración de acético, AGV totales y menor proporción acético: propiónico en comparación con el control. La inclusión de leguminosas taniníferas también estuvo asociada con un aumento en las poblaciones de hongos y de *F. succinogenes*, mientras las poblaciones de *R. flavefaciens* presentaron susceptibilidad a la inclusión de las leguminosas con taninos, pues sus poblaciones disminuyeron con respecto al control. En el caso de las arqueas metanogénicas, las poblaciones disminuyeron significativamente con la adición de Flemingia pero se mantuvieron constantes con respecto al control con la inclusión de Calliandra. Se concluye que la inclusión de diferentes leguminosas en mezclas forrajeras

parece tener efectos diferentes sobre poblaciones microbiales ruminales, siendo este efecto aparentemente dependiente de la relación específica entre la clase de tanino y cada grupo microbiano en particular.

## LITERATURA CITADA

- Barahona, R., 1999. *Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships*. Ph.D. Thesis, Department of Agriculture, The University of Reading. 353 pp.
- Barahona, R., Lascano, C., Narvaez, N., Owen, E., Morris, F. y Theodorou, M., 2003. In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 1256-1266.
- Coates, D.B., 1995. Tropical legumes for Large Ruminants. En: D'Mello, J.P.F y Devendra, C. (eds.). *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. Wallingford. UK. USA. CAB International. p. 191-230.
- Denman, A.E. y McSweeney C.S., 2005. Quantitative (real time) PCR. En: Makkar, H. y McSweeney, C. (eds.). *Methods in gut microbial ecology for ecology for ruminants*. Springer, IAEA, FAO.
- Devendra, C. y Pun, H.L., 1990. Practical technologies for mixed small farm systems in developing countries. En: Mack, S. (ed.). *Strategies for sustainable animal agriculture in developing countries*. *FAO Animal Production and Health Paper. No. 107*, p. 135-156.
- Doane, P.H., Schofield, P. y Pell, A.N., 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the in vitro fermentation of six forages. *Journal of Animal Science* **75**: 3342-3352.
- Ferrell, C.L., 1988. Energy Metabolism. En Church, D. C. (ed). *The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition*. Illinois. Waveland Press, Inc.

- Gill, M. y Powell, C., 1993. Prediction of associative effects of mixing feeds. En: Tingshuang, G. (ed). *Increasing livestock production through utilization of local resources*. Proceedings of a workshop in Beijing, China. p. 393-405.
- IAEA, 2004. *qPCR Workshop for Rumen Microbial Ecology*. Brisbane, Australia.
- Martín, E., Rodríguez, F., Cañón, S., Mayorga, O., Arcos, M.L., Ossa, F., Arreaza, L.C., Rodríguez, J. y Montes, M.I., 2003. Avances para el conocimiento de microorganismos ruminales aislados de bovinos de las razas criollas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **16(Supl.):** 54
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Yanke, L. J. y Cheng, K.J., 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Canadian Journal of Microbiology* **40:** 298-305.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* **17:** 297-304.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., y France, J.A., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48:** 185-197.

# Monitoreo de la dinámica poblacional in vivo de los principales grupos de microorganismos ruminales en respuesta a la inclusión de *Vigna unguiculata*, *Flemingia macrophylla* y *Calliandra calothyrsus* en la dieta de ovinos africanos

Claudia P. Sanabria<sup>1,2</sup>, Rolando Barahona<sup>1</sup>, Lina M. Monsalve<sup>3,4</sup>, Tassilo T. Tiemann<sup>5</sup>, Carlos E. Lascano<sup>3</sup>, Hans Dieter Hess<sup>6</sup>, Elizabeth Martín Martínez<sup>1</sup> y Fernando Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Microbiología Molecular, Programa de Fisiología y Nutrición Animal, Corpoica, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, cpsanabria@gmail.com

<sup>3</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia

<sup>4</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Palmira, Colombia

<sup>5</sup>ETH Zurich, Instituto de Ciencia Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza

<sup>6</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-1725 Posieux, Suiza

## INTRODUCCION

Las pasturas en zonas tropicales presentan normalmente bajos contenidos de proteína en comparación con las pasturas de zonas templadas (Flores et al., 1998). Una posible solución a este problema, es el uso de leguminosas (arbóreas) que presenten un alto contenido de proteína. Sin embargo, algunas de estas leguminosas adaptadas a suelos de baja fertilidad y con tolerancia a sequía contienen taninos, los cuales se unen fácilmente a la proteína (Mueller-Harvey y McAllan, 1992), impidiendo que esta sea digerida por el animal. Se considera que diferentes tipos y concentraciones de taninos establecen distintas clases de asociaciones con la proteína de leguminosas siendo algunas perjudiciales y otras benéficas para el animal (Vitti et al., 2005). Sin embargo, aún no hay total claridad sobre estos efectos, y poco se conoce sobre el efecto específico de los taninos en leguminosas tropicales sobre las poblaciones microbiales (McSweeney et al., 2001). Se ha sugerido que las leguminosas con altas concentraciones de taninos condensados (TC), pueden mezclarse con forrajes bajos o libres de taninos para reducir pérdidas de amonio en el proceso de fermentación en el rumen debido a la capacidad de los taninos de ligarse con proteínas (Coates, 1995). Para poder diseñar mezclas de leguminosas con y sin taninos es importante

mejorar nuestro entendimiento del efecto de los taninos provenientes de diferentes leguminosas sobre los microorganismos ruminales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las fluctuaciones en la dinámica poblacional del ecosistema microbiano en animales alimentados con una dieta basal de una gramínea baja en proteína suplementada con mezclas de leguminosas con y sin taninos.

## MATERIALES Y METODOS

En la estación CIAT Quilichao se realizó un experimento in vivo en donde se utilizaron 10 ovinos de tipo africano con fistula ruminal y duodenal. Según su peso vivo los ovinos se dividieron en grupos de animales livianos (26.11 kg de PV) y pesados (34.56 kg de PV). Los animales permanecieron en jaulas metabólicas y se les ofrecieron agua y sal mineralizada a voluntad. Los animales fueron alimentados alternativamente con una de 5 dietas (tratamientos) diferentes (Cuadro 1) en un diseño de Cuadrado Latino 5 x 5 replicado.

Las dietas estuvieron compuestas de heno de gramínea de baja calidad (*Brachiaria dictyoneura* cv. Llanero) complementado con heno de *Vigna unguiculata* sin taninos sola o en mezcla con leguminosas con taninos (*Calliandra calothyrsus* o de *Flemingia macrophylla*). A cada animal se le

**Cuadro 1.** Dietas (tratamientos) evaluadas con ovinos alojados en jaula metabólica.

Tratamiento	Composición <sup>1</sup>
1 (Control)	Brachiaria (55%) + Caupí (45%)
2	Brachiaria (55%) + Caupí (15%) + Calliandra 22310 (30%)
3	Brachiaria (55%) + Caupí (30%) + Calliandra 22310 (15%)
4	Brachiaria (55%) + Caupí (15%) + Flemingia (30%)
5	Brachiaria (55%) + Caupí (30%) + Flemingia (15%).

<sup>1</sup> Brachiaria, *Brachiaria dictyoneura*; Caupí, *Vigna unguiculata*; Flemingia, *Flemingia macropylla*; Calliandra, *Calliandra calothyrsus*.

suministraron 45 g de materia seca (MS) por kg de peso metabólico (PV<sup>0.75</sup>) por día. Los suplementos de leguminosa se ofrecieron a los animales en forma individual con el objeto de facilitar el manejo de los rechazos. Las leguminosas se ofrecieron entre las 7:00 y las 10:00 h y entre las 13:00 y las 16:00 h, en el resto del día se ofreció la gramínea. La composición química de los forrajes suministrados se presenta en la Cuadro 2.

Se realizaron 5 períodos experimentales de 19 días, de los cuales 10 días fueron de ajuste o acostumbramiento y 9 días de medición. Las muestras para el monitoreo de la dinámica de las poblaciones ruminales se tomaron tanto en el día 0 como en el 19. Entre períodos experimentales se estableció un tiempo de descanso de 10 días. Durante este período, los animales pastorearon libremente en praderas de *Brachiaria decumbens*. Para el monitoreo de las poblaciones ruminales en las muestras obtenidas en los días 0 y 19 de cada periodo experimental, se utilizó la técnica de PCR-TR. Para cada muestra se utilizaron los primers para hongos, metanogénicas, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* (blanco), y primers referencia (bacterias totales). En PCR-TR el Ct (*cycle threshold*) es el dato reportado por el equipo para cada población monitoreada, la cuantificación de las poblaciones blanco se realizó de manera relativa

con respecto a la población referencia con el índice  $2^{-\Delta Ct}$  (donde  $\Delta Ct = Ct \text{ blanco} - Ct \text{ referencia}$ ) y en los tratamientos con respecto al control usando el índice  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  (donde  $\Delta \Delta Ct = \Delta C \text{ tratamiento} - \Delta C \text{ control}$ ) (Denman y McSweeney, 2005). Los datos fueron analizados por ANOVA usando el procedimiento de GLM de SAS versión 9.1. Mínimos cuadrados medios fueron ajustados por el método de Tukey para comparar las medias ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

Un resultado del experimento con ovinos que muy posiblemente influyó en las variables de respuesta medidas en los animales fue que los consumos de leguminosas con taninos fueron inferiores a lo ofrecido a pesar de que la oferta total de forraje fue baja. Como resultado de este menor consumo la proporción de leguminosa con taninos en la dieta fue de 10 y 15% en promedio y no de 15 y 30% como se había diseñado (ver Cuadro 1). Debido a problemas de muestreo, las muestras del segundo período experimental se perdieron. En consecuencia, los resultados que se reportan son los de 10 animales en cuatro períodos experimentales. Las mayores densidades de hongos se observaron en los tratamientos Caupí 30% + Flemingia 15% y Caupí 30% + Calliandra 15%, sugiriendo que 10% de leguminosas taniníferas en la dieta promovió un aumento en las

**Cuadro 2.** Composición bromatológica (% de materia seca) de las especies forrajeras utilizadas en el ensayo con ovinos.

Forraje	FDN	FDA	Proteína	Ceniza	MO
<i>Calliandra calothyrsus</i>	49.0	38.6	15.9	5.5	94.5
<i>Flemingia macropylla</i>	60.3	37.6	19.2	5.4	94.6
<i>Vigna unguiculata</i>	59.0	31.1	18.7	11.2	88.8
<i>Brachiaria humidicola</i>	81.1	41.6	6.5	8.8	91.2

poblaciones de hongos (Cuadro 3). A su vez, el tratamiento Caupí 15% + Flemingia 30% estuvo asociado con las menores poblaciones de hongos (tan solo 15% de lo observado con Caupí 30% +Calliandra 15%), lo que sugiere que en *F. macrophylla* existen compuestos que en altos niveles podrían ser deletéreos para las poblaciones fungales del rumen. Este resultado es contrario a lo encontrado en un experimento in vitro con las mismas leguminosas (Sanabria, 2006).

Las bacterias celulolíticas *F. succinogenes*, al igual que en el caso de los hongos, variaron en respuesta a las dietas evaluadas (Cuadro 3). Las mayores densidades poblacionales se observaron con Caupí 30% + Calliandra 15%, mientras que las menores (26% de las poblaciones más altas) se observaron con Caupí 15% + Calliandra 30%. Por otra parte, las mayores densidades poblacionales de *R. flavefaciens* se observaron con Caupí 15% + Flemingia 30%, mientras que las menores se observaron con Caupí 15% + Calliandra 30% y en el control. Las densidades poblacionales en el control y en la dieta con más Calliandra fueron en promedio sólo el 3 y 4% de lo observado con el tratamiento de Caupí 15% + Flemingia 30%. En un experimento in vivo McSweenwey et al. (2001), reportó que la inclusión de 30% de Calliandra en la dieta estuvo asociada con una reducción en la población de las principales bacterias

degradadoras de fibra en el rumen (*F. succinogenes* y *Ruminococcus* spp.). Estos investigadores sugirieron que la reducción de bacterias celulolíticas fue debido a los TC en Calliandra, debido a que el número de estos microorganismos y la abundancia relativa de ambas poblaciones incrementaron cuando se incluyó PEG en la dieta para neutralizar a los taninos libres.

En el caso de las poblaciones metanogénicas, la variabilidad observada entre tratamientos fue menor en comparación a la variabilidad observada con otras poblaciones evaluadas en este estudio (Cuadro 3). Las mayores poblaciones de metanogénicas se observaron con Caupí 15% + Calliandra 30% y las menores (67% de los mayores valores) en el tratamiento de Caupí 15% + Flemingia 30%. Estos resultados son contrarios a lo propuesto por Hess et al. (2003) respecto a que ciertos compuestos presentes en *C. calothyrsus* (e.g. taninos) podrían afectar directamente a los microorganismos productores de metano. Al analizar los datos de las poblaciones ruminales en los tratamientos con respecto al control mediante el índice  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (datos no presentados) se corroboraron muchos de los resultados mostrados en la Cuadro 3.

En términos de maximizar la actividad de microorganismos en el rumen, sería deseable identificar dietas que incrementen densidades de

**Cuadro 3.** Relación ( $\times 10^{-4}$ ) de las poblaciones blanco con relación a bacterias totales, por medio del índice  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en fluido ruminal de ovinos africanos alimentados con una gramínea de baja calidad suplementada con leguminosas con o sin taninos.

Días	Tratamiento <sup>1</sup>	Hongos	F. succinogenes	R. flavefaciens	Metanogénicas
0	Control	0.65	17.8	1.18b <sup>2</sup>	3.5
	Cau 15% + Call 30%	0.50	3.0	0.64b	2.5
	Cau 15% + Flem 30%	0.21	3.8	31.1a	1.8
	Cau 30% +Call 15%	0.53	21.8	2.23ab	3.2
	Cau 30% + Flem 15%	0.48	8.0	1.3b	1.3
19	Control	0.34	4.3	0.38b	8.1
	Cau 15% + Call 30%	0.80	5.2	0.57b	9.9
	Cau 15% + Flem 30%	0.14	8.3	8.36a	6.4
	Cau 30% +Call 15%	1.68	8.9	2.69ab	7.3
	Cau 30% + Flem 15%	1.89	7.1	4.14ab	8.9

<sup>1</sup>Cau, Caupí; Flem, Flemingia; Call, Calliandra.

<sup>2</sup>Letras diferentes en la columna por días indican medias con diferencia significativa, P<0.05.

bacterias celulolíticas para de esa forma maximizar degradación de la fibra y producción de ácidos grasos volátiles que proporcionen mayor energía para el animal y sus procesos productivos (Owens y Goetsch, 1993). Así mismo, es de interés identificar dietas que contribuyan a reducir poblaciones de arqueas metanogénicas (o inhibición de su actividad productora de CH<sub>4</sub>) para de esa forma también reducir pérdidas de energía para el animal en forma de metano (Pabón, 2004). Teniendo en cuenta los resultados presentados en la Cuadro 3 especialmente en el día 19, la dieta que mejor se ajusta a lo descrito anteriormente es la de Caupí 15% + Flemingia 30%. Con esta dieta en relación al control se presentó un incremento importante en las poblaciones de hongos y bacterias celulolíticas y el menor incrementó en las arqueas metanogénicas, poblaciones que no necesariamente tienen una relación directa con la producción de metano.

## CONCLUSIONES

El efecto de diferentes mezclas de leguminosas con y sin taninos como suplemento de una gramínea de baja calidad en poblaciones de hongos y bacterias celulolíticas fue muy variable y difícil de interpretar. La fluctuación de estas poblaciones no estuvo consistentemente asociada con especie de leguminosa con o sin taninos o con el nivel de inclusión de las leguminosas en la dieta. Es posible que el consumo bajo variable de leguminosas con taninos por ovinos en jaula metabólica observado en este estudio hubiese determinado que los cambios en poblaciones microbiales fuesen muy variables.

## LITERATURA CITADA

Coates, D.B., 1995. Tropical legumes for Large Ruminants En: D'Mello, J.P.F y Devendra, C. (eds). *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. Wallingford. UK. USA. CAB International. p. 191-230.

Denman, A.E. y McSweeney, C.S., 2005. Quantitative (real time) PCR. En: Makkar, H. y McSweeney, C. (eds). *Methods in gut microbial ecology for ecology for ruminants*. Springer, IAEA, FAO.

Flores, O.I., Bolivar D.M., Botero, J.A. y Ibrahim M.A., 1998. Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial forrajera para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development* Vol. 10, No. 1.

Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E. y Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 703–713.

McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R. y Krause, D.O., 2001. Effect of the tropical forage Calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 78-88.

Mueller-Harvey, I. y McAllan, A.B., 1992. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology* **1**: 151-217.

Owens, F.N. y Goetsch, A.L., 1993. Ruminal Fermentation. En: Church, D.C. (ed.). *The Ruminant animal, Digestive Physiology and Nutrition*. USA. Waveland Press Inc.

Pabón, M.L., 2004. *Bioquímica Ruminal*. Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos, Bogotá, Colombia.

Sanabria, C.P., 2006. *Influencia de taninos condensados sobre poblaciones microbiales del ecosistema ruminal monitoreadas por PCR en tiempo real*. Tesis de maestría, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Vitti, D.M., Abdalla, A.L., Bueno, I.C., Silva J.C., Costa, C., Bueno, M.S., Nozella, E.F., Longo, C., Vieira, E.Q., Cabral, S.L., Godoy, P.B. y Mueller-Harvey, I., 2005. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Science and Technology* **119**: 345-361.

# Valor nutricional de ensilajes y henos de mezclas de leguminosas con y sin taninos

Laila Bernal<sup>1,2</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup> y Carlos E. Lascano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Palmira, Colombia, [lcbernalb@palmira.unal.edu.co](mailto:lcbernalb@palmira.unal.edu.co)

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia

## INTRODUCCION

Una alternativa muy conocida para la alimentación de ganado en la época seca es la de conservar forraje en la forma de ensilaje o heno. Sin embargo, uno de los problemas que se presenta en la conservación de forrajes en forma de ensilaje es el de pérdidas de N en el proceso de fermentación sobre todo con especies de leguminosas con proteína altamente degradable. Dado que los taninos presentes en algunas leguminosas tropicales protegen la proteína se consideró que una alternativa para reducir la pérdida de N en el proceso de ensilaje era la de incluir mezclas de leguminosas con y sin taninos. La presente investigación tuvo como objetivo el determinar parámetros de fermentación in vitro de ensilaje hechos con mezclas de leguminosas con taninos (*Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*), y sin taninos (*Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata*) utilizando como control henos de las mismas leguminosas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos in vitro. En el primer ensayo se evaluó el volumen de gas producido cuando se fermentaron ensilajes y henos de las leguminosas con y sin taninos. En el segundo ensayo se utilizó el sistema Rusitec para evaluar el efecto de mezclas de leguminosas con taninos y sin taninos ensiladas o henificadas en parámetros de fermentación tales como producción de metano y degradación de proteína y de fibra.

### Experimento 1: producción de gas

En la prueba de producción de gas se seleccionaron como especies forrajeras con presencia de taninos *Calliandra calothyrsus*

(CIAT 22310) y *Flemingia macrophylla* (CIAT 17403), y sin taninos Caupí (*Vigna unguiculata* CIAT 1088/4, 288, 391, 9611 y 715) y *Cratylia argentea* (CIAT 18516-18668) cosechadas en la estación experimental CIAT Santander de Quilichao, Departamento del Cauca. Se emplearon 28 tratamientos (14 con ensilaje y 14 con henos), y tres repeticiones por tratamiento de los cuales 14 (T1 a T 14) tenían adición de PEG (polietileno glicol) para inactivar a los taninos. Los tratamientos fueron: T1, ensilaje de *C. calothyrsus* 100%; T2, ensilaje *Flemingia*; T3, ensilaje Caupí 100%; T4, ensilaje *Cratylia* 100%; T5, ensilaje *Calliandra*/Caupí 33/67%; T6, ensilaje *Flemingia*/Caupí 33/67%; T7, ensilaje *Cratylia*/Caupí 33/67%; T8, heno de *Calliandra* 100%; T9, heno de *Flemingia*; T10, heno Caupí 100%; T11, heno *Cratylia* 100%; T12, heno *Calliandra*/Caupí 33/67%; T13, heno *Flemingia*/Caupí 33/67%; T14, heno *Cratylia*/Caupí 33/67%.

Para determinar la magnitud y la tasa de fermentación se utilizó el método de producción de gas propuesto por Theodorou et al. (1994). Los datos de producción de gas obtenidos para cada tratamiento y la tasa potencial de degradación después del periodo de incubación de 144 horas con microorganismos del rumen fue ajustada al modelo matemático de regresión exponencial propuesto por Gompertz con el fin de determinar la producción total de gas. Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) en el programa SAS (versión 9.1).

### Experimento 2: Rusitec

Para el segundo ensayo in vitro se utilizó el Rusitec desarrollado por Czerkawski y Breckenridge (1977) y modificado por

Machmüller et al. (2002). Los forrajes que se utilizaron fueron *Calliandra calothyrsus* (22310) con presencia de taninos y *Vigna unguiculata* (CIAT 1088/4, 288, 391, 9611 y 715) carente de taninos, las cuales se cosecharon, se secaron al sol por tres días para henificar. El material fresco se ensiló por 56 días. Estos materiales se distribuyeron en 8 tratamientos cada uno con 4 repeticiones así: T1, ensilaje de Calliandra; T2, ensilaje de Caupí 100%; T3, ensilaje de Calliandra/Caupí (67/33%); T4, ensilaje de Caupí/Calliandra (67/33%); T5, heno de Calliandra 100%; T6, heno de Caupí 100%; T7, heno de Calliandra/Caupí (67/33%); T8, heno de Caupí/Calliandra (67/33%).

En los diferentes ensilajes y henos se midió la composición química y la degradación de materia orgánica y proteína. Además se determinó la producción de metano y la cantidad de amonio asociado con la fermentación de los ensilajes y henos. Los resultados obtenidos se analizaron como bloques completos al azar en programa SAS, versión 9.1 de 2003.

## RESULTADOS

### Experimento 1

Los resultados de la prueba de producción de gas mostraron que los ensilajes tuvieron una mayor ( $P<0.01$ ) tasa de producción de gas que los henos y que la adición de polietileno glicol (PEG) no

tuvo efecto en producción de gas en henos y ensilajes (Cuadro 1). Por otra parte, hubo un efecto altamente significativo ( $P<0.001$ ) debido al tipo de forraje incubado. La mayor tasa de producción de gas se observó con Caupí 100% y la menor con las leguminosas con taninos (Calliandra y Flemingia), siendo la producción de gas con Cratylia y mezclas de leguminosas con y sin taninos intermedia.

### Experimento 2

La composición química de los henos y ensilajes de leguminosas solas y en mezcla usadas en la prueba de Rusitec varió debido a tratamientos (Cuadro 2).

Se observó una disminución en el nivel de PC en Calliandra y Caupí cuando se ensilaron las leguminosas solas o en mezcla en comparación al respectivo heno. El proceso de ensilaje también aumentó las fracciones de fibra (FND y FAD) en Calliandra pero no en Caupí o en las mezclas. La degradación de MO fue consistentemente más alta en las leguminosas ensiladas que en las henificadas (Cuadro 3). Sin embargo, fue evidente que la degradabilidad de la MO fue mayor tanto en ensilaje como heno de Caupí en comparación con Calliandra. Esto es consistente con la menor degradabilidad de la MO en las mezclas de leguminosas con más Calliandra.

**Cuadro 1.** Efecto de forma de conservación del forraje y de adición de PEG en la tasa de producción de gas con la fermentación de leguminosas con y sin taninos).

Tratamientos	a (ml) asíntota	b (h) tasa inicial	c (ml/h) tasa crecimiento
<b>Efecto Procesamiento</b>			
Henos	159.7a <sup>1</sup>	2.49a	0.0614b
Ensilajes	144.6b	2.22b	0.0691a
<b>Efecto PEG</b>			
Con PEG	156.0a	2.39a	0.0657a
Sin PEG	148.2a	2.32a	0.0648a
<b>Efecto Forrajes</b>			
Caupí 100%	214.1a	2.64a	0.0875a
Caupí/Cratylia 33/67%	188.2b	2.53ab	0.0756b
Caupí/Calliandra 33/67%	172.6c	2.38bc	0.0683c
Cratylia 100%	159.3d	2.25cd	0.0627d
Caupí/Flemingia 33/67	156.1d	2.39bc	0.0745b
Calliandra 100%	93.7e	2.16d	0.0403f
Flemingia 100%	80.8f	2.14d	0.0480e

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa,  $P<0.05$ .

**Cuadro 2.** Concentración de materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) de ensilajes y henos de leguminosas con y sin taninos.

Tratamientos	MO	PC	FDN	FDA
Ensilaje Calliandra 100%	93.4b <sup>1</sup>	14.8b	55.2a	51.9 <sup>a</sup>
Ensilaje Caupí 100 %	89.1d	13.2c	32.4c	30.0c
Ensilaje Caupí/Calliandra 33/67%	90.6c	13.6c	39.8b	37.1b
Ensilaje Calliandra/Caupí 33/67%	90.9c	12.8c	43.1b	40.1b
Heno Calliandra 100%	94.7a	15.8ab	41.4b	39.8b
Heno Caupí 100%	88.2e	16.1ab	41.1b	36.4b
Heno Caupí/Calliandra 33/67%	90.2c	16.3a	43.6b	39.9b
Heno Calliandra/Caupí 33/67%	93.2b	15.9ab	42.5b	39.9b

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ .

La degradabilidad de la PC fue mayor en ensilaje y en heno de Caupí en comparación con ensilaje y heno de Calliandra, lo cual se reflejó en mayor degradabilidad de proteína en las mezclas con más Caupí (Cuadro 3).

### CONCLUSIONES

La conservación de leguminosas en forma de ensilaje resultó en pérdidas de N (medida en términos de PC) tanto en especies con taninos como en especies sin taninos en comparación a la henificación (control). La mezcla de

leguminosas con y sin taninos no tuvo mayor efecto en reducir pérdidas de N en el forraje ensilado. Por otra parte, los resultados de estos ensayos mostraron que el proceso de ensilaje de leguminosas solas y sin taninos aumentó la degradación de proteínas en comparación con la henificación; lo cual no se observó en las leguminosas con taninos. Se concluye que la estrategia de hacer mezclas de leguminosas con y sin taninos para ensilar no parece reducir las pérdidas de N en el material ensilado, pero que la inclusión de leguminosas con taninos redujo la degradabilidad ruminal de la proteína en el forraje ensilado.

### LITERATURA CITADA

- Czerkawski, J.W. y Breckenridge, G., 1977. Desing and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *British Journal of Nutrition* **38**: 371-384.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. y France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48**: 185-197.

**Cuadro 3.** Degradación aparente de materia orgánica (MO) y proteína cruda (PC) en ensilajes y henos de leguminosas con y sin taninos solas o en mezcla.

Tratamientos	Degradación (%)	
	MO	PC
Ensilaje Calliandra 100%	29.8e <sup>1</sup>	13.8c
Ensilaje Caupí 100%	56.8a	49.8a
Ensilaje Calliandra/Caupí 33/67	54.5a	38.0ab
Ensilaje Caupí/Calliandra 33/67	42.8cd	17.7c
Heno Calliandra 100%	29.2e	17.7c
Heno Caupí 100%	51.9ab	32.0bc
Heno Calliandra/Caupí 33/67	45.9bc	30.0bc
Heno Caupí/Calliandra 33/67	37.9d	19.6c

<sup>1</sup> Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ .

## Efecto de leguminosas con taninos en la emisión de metano en ovinos

Tassilo Tiemann<sup>1</sup>, Hans-Rudolf Wettstein<sup>1</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup>,  
Michael Kreuzer<sup>1</sup>, y Hans Dieter Hess<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza,  
ttiemann@inw.agrl.ethz.ch

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT),  
Cali, Colombia

<sup>3</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-  
1725 Posieux, Suiza

### INTRODUCCION

Desde hace tiempo rumiantes están reconocidos como una de las fuentes principales de emisión de metano en el mundo y así juegan un papel importante en el calentamiento climático del planeta. Ya se han emprendido muchos intentos de disminuir la actividad metanogénica en el rumen, pero éxitos se encuentran muy pocos. El descubrimiento, que taninos de *Lotus corniculatus* suelen reducir la emisión de ese gas de efecto invernadero (Woodward et al., 2001), resultó en un nuevo resalte de investigación sobre taninos y su efecto sobre la digestión del rumiante. Este ensayo sigue esa inspiración y tiene como objetivo una evaluación de la calidad de las leguminosas taniníferas principalmente usadas en este proyecto in vivo, con énfasis en su efecto sobre la emisión de metano en rumiantes. En este resumen se presentan algunos resultados preliminares del ensayo.

### MATERIALES Y METODOS

Se emplearon seis ovejas machos castrados, de 2 meses de edad, del mismo origen y del mismo padre. Los animales se alojaron en jaulas individuales pero con la posibilidad de contacto

físico con su animal vecino y con contacto visual y auditivo con todos los demás animales. El primer mes los animales se acostumbraron a su nuevo ambiente y también a las jaulas metabólicas usadas en el experimento. Después de 3 semanas se cambió lentamente la alimentación del heno suizo de alta calidad a la dieta tropical (*Brachiaria humidicola* y *Vigna unguiculata*). Después de un mes se inició el ensayo con el primer período de acostumbramiento. El diseño del ensayo fue un cuadrado latino (6 animales x 6 dietas = 6 periodos) con cuatro fases por periodo: acostumbramiento a la dieta (14 días), colección y medición (5 días), cámaras de respiración (2 días), descanso (7 días). Las dietas se calcularon cada semana con relación al peso metabólico de los animales (60 g de forraje/kg peso metabólico), y los diferentes forrajes se ofrecieron por separado una vez al día por la mañana. La composición de dietas está descrita en la Cuadro 1. El consumo de forraje se registró continuamente.

Durante la fase de respiración se midieron además las cantidades de oxígeno consumido y de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> emitidos. Para la cuantificación

Cuadro 1. Dietas utilizadas en el ensayo.

Gramínea	Leguminosa de buena calidad	Leguminosa taninífera
<i>Brachiaria humidicola</i> 100%		
<i>Brachiaria humidicola</i> 55%	<i>Vigna unguiculata</i> 45%	
<i>Brachiaria humidicola</i> 55%	<i>Vigna unguiculata</i> 30%	<i>Calliandra calothyrsus</i> 15%
<i>Brachiaria humidicola</i> 55%	<i>Vigna unguiculata</i> 15%	<i>Calliandra calothyrsus</i> 30%
<i>Brachiaria humidicola</i> 55%	<i>Vigna unguiculata</i> 30%	<i>Flemingia macrophylla</i> 15%
<i>Brachiaria humidicola</i> 55%	<i>Vigna unguiculata</i> 15%	<i>Flemingia macrophylla</i> 30%

de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> se usó un analizador de gases (Binos 1001, Fisher-Rosemount, Baar-Walterswil, Switzerland), para la de oxígeno un analizador de oxígeno (Oxymat 6, Siemens AG, Karlsruhe, Germany).

## RESULTADOS

Durante los períodos de medición el consumo de la dieta basal (*Brachiaria* y *Vigna unguiculata*) fue superior a 90%. El consumo de leguminosas taniníferas superó 85% fuera de pocas excepciones. En general los animales se acostumbraron bien a las plantas taniníferas pero unos individuos no consumieron o la una o la otra especie. En este experimento uno de 6 animales rechazó *Calliandra* y uno *Flemingia* a un porcentaje significativo (>50%). Los resultados preliminares de la liberación de metano muestran un efecto claro de las dos leguminosas taniníferas. La emisión con las dietas conteniendo 30% (p/p) de *Calliandra* o *Flemingia* resultan en significativamente menos metano (P<0.05) que las dietas de *Brachiaria* sola o suplementada con *Vigna*.

La disminución en la producción de CH<sub>4</sub> expresada por kg de forraje consumido fue alrededor del 20% y entre las dos leguminosas no se observaron diferencias. Relativo al peso metabólico la emisión de metano es mucho

Cuadro 2: Emisión diaria de metano de ovejas alimentadas con diferentes dietas.

Tratamiento	l/kg peso metabólico	l/kg de forraje consumido
<i>Brachiaria</i>	1.68b	28.5 <sup>a</sup>
+ <i>Vigna</i>	1.83a	28.4 <sup>a</sup>
+ <i>Vigna</i> + <i>Calliandra</i> 15%	1.67b	26.2b
+ <i>Vigna</i> + <i>Calliandra</i> 30%	1.35d	23.0c
+ <i>Vigna</i> + <i>Flemingia</i> 15%	1.65b	26.4b
+ <i>Vigna</i> + <i>Flemingia</i> 30%	1.42c	23.8c

mayor (P<0.05) en el tratamiento con suplementación de *Vigna* que en los demás tratamientos y *Calliandra* demuestra un efecto más pronunciado (P<0.05) que *Flemingia* en la disminución de CH<sub>4</sub>. Comparado con la *Brachiaria* sola, la suplementación con 15% de leguminosa taninífera no muestra efecto (P>0.05) cuando la emisión de metano se expresa por peso metabólico. Sin embargo, cuando se expresa por kg de forraje consumido, la emisión de metano es aproximadamente un 7% menor (P<0.05) en los tratamientos con *Calliandra* o *Flemingia* que con *Brachiaria* sola o suplementada con *Vigna* (Cuadro 2).

## CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento de la reducción de la emisión metano mediante los taninos presentes en *Lotus corniculatus* se busca semejante efecto también para leguminosas del trópico, donde se encuentra una gran parte del ganado mundial. Los resultados presentados son preliminares e incompletos pero muestran ya claramente un efecto de leguminosas taniníferas tropicales sobre la liberación de metano en rumiantes. Para mostrar un efecto claro la adición de leguminosa taninífera debe exceder el 15%. Con un consumo alrededor del 30% se puede esperar una reducción en la producción de metano del 20%, comparado con dietas basadas en una gramínea sola o suplementada con una leguminosa de alta calidad sin taninos.

## LITERATURA CITADA

Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J. y Lassey, K.R., 2001. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emissions from ruminants. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **61**: 23-26.

## Fermentación ruminal, flujo de proteína al duodeno y absorción de N en ovinos alimentados con mezclas de leguminosas

Lina M. Monsalve<sup>1,2</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup> y Carlos E. Lascano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Palmira, Colombia, [lmonsalve\\_castro@yahoo.es](mailto:lmonsalve_castro@yahoo.es)

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia

### INTRODUCCION

Las gramíneas representan una de las fuentes principales de alimentación de los rumiantes en los sistemas de producción en el trópico. Generalmente las gramíneas tropicales son de baja o moderada digestibilidad, deficientes en nutrientes esenciales (v.g. proteína cruda) y presentan niveles altos de fibra y bajos niveles de carbohidratos solubles y almidones. Esto a su vez resulta en baja actividad microbiana en el rumen que puede causar imbalances en los productos de digestión y en un uso ineficiente de la energía metabolizable. Por lo tanto, es muy importante desarrollar nuevas estrategias y sistemas de alimentación que contribuyan a incrementar la eficiencia de fermentación ruminal en animales alimentados con dietas a base de gramíneas de baja calidad para asegurar niveles adecuados de amonio ruminal, proteína bacteriana y proteína sobrepasante. Esto se puede lograr mediante la suplementación con leguminosas las cuales presentan mayores niveles de N que las gramíneas. Si se elimina la deficiencia de N en la dieta, se puede incrementar la actividad de los microorganismos fibrolíticos, resultando en una mejor degradación de la fibra de los forrajes. Por otra parte, en algunas leguminosas con potencial para ser utilizadas en los sistemas de alimentación en los trópicos existen factores denominados antinutricionales. Entre estos están los taninos condensados los cuales son capaces de reducir la digestión de fibra y proteína y por lo tanto afectar la fermentación ruminal (Carulla, 1994). Sin embargo, los taninos condensados en niveles bajos pueden tener efectos benéficos en la nutrición de rumiantes como es el de evitar pérdidas de amonio en el rumen al reducir la degradación de proteínas e incrementar el flujo

de nitrógeno al duodeno (fracción sobrepasante) y de esa forma asegurar una mayor absorción de N en el tracto posterior (Fässler 1995). El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de suplementar mezclas de leguminosas con niveles variables de taninos condensados sobre el consumo, la fermentación ruminal y la utilización de nitrógeno en ovinos alimentados con una gramínea de baja calidad.

### MATERIALES Y METODOS

Se realizó un experimento con ovinos en la estación experimental de CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) en Santander de Quilichao, Cauca, Colombia. Se utilizaron diez ovinos machos adultos castrados de tipo africano divididos en dos grupos livianos y pesados (peso vivo (PV) 26.11 y 34.56 kg), provistos de cánulas flexibles permanentes en rumen y duodeno. Los animales se alojaron en jaulas metabólicas individuales y se asignaron aleatoriamente a un diseño Cuadrado Latino 5 x 5 replicado. Los cinco tratamientos consistieron en diferentes proporciones de leguminosa ofrecida como suplemento a la gramínea: T1, *Brachiaria dictyoneura* cv. Llanero 55% + Caupí (*Vigna unguiculata*) 45%; T2, *Brachiaria* 55% + Caupí 30% + *Calliandra calothyrsus* 22310 15%; T3, *Brachiaria* 55% + Caupí 15% + *Calliandra* 22310 30%; T4, *Brachiaria* 55% + Caupí 30% + *Flemingia macrophylla* 15%; T5, *Brachiaria* 55% + Caupí 15% + *Flemingia* 30%.

Los animales recibieron una oferta diaria de forraje de 45 g MS/kg PV<sup>0.75</sup>. Todos los forrajes se ofrecieron secos al sol y sin moler separadamente en dos raciones diarias. La leguminosa se ofreció entre las 07:00 y 010:00 h

y entre las 13:00 y 16:00 h, y la gramínea durante el resto del día. Los animales tuvieron libre acceso a una sal mineralizada comercial. Se suministró agua fresca 3 veces al día. Los cinco periodos experimentales fueron de 18 días cada uno, con 10 días de adaptación a las dietas y 8 días de medición. El peso vivo se midió al inicio y final de cada periodo experimental después de un tiempo de ayuno de 17 h. Para calcular consumo diario y digestibilidad de la MS se midieron los rechazos de forraje de cada fracción suministrada y la producción total de heces durante 5 días en el periodo de medición. La digesta en el duodeno se midió cada 6 horas durante los días 6 y 7 del periodo de medición. El día 8 se tomaron muestras de líquido ruminal cada 6 horas, además se tomaron 200 ml de líquido ruminal para determinación de purinas. Como marcador interno de la digesta para estimar el flujo de proteína al duodeno se utilizó la fibra indigerible en detergente ácido (FAID indigerible).

En el forraje ofrecido, los rechazos, las heces y la fase sólida de la digesta duodenal se determinó ceniza, fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) (Van Soest et al., 1991), FAID, nitrógeno total por Kjeldahl, y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). El nitrógeno microbial en el líquido ruminal se determinó utilizando purinas como marcador (Zinn y Owens, 1986). En el líquido ruminal y en la fase sólida de la digesta duodenal se determinó el contenido de NH<sub>3</sub> y nitrógeno total. Se realizaron análisis de taninos condensados por el método de butanol-HCL (Terrill et al., 1992, modificado por Barahona, 1999) en los forrajes ofrecidos.

## RESULTADOS

La gramínea utilizada en este experimento presentó un contenido de PC bajo y valores de FDN y FDA altos, con una DIVMS de 58.3% (Cuadro 1). Las leguminosas con taninos utilizadas como suplemento (*Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla*) presentaron niveles altos de PC, aunque no superiores al de *V. unguiculata* (Caupí). El contenido de FDN fue numéricamente mayor en *F. macrophylla* y la FDA fue mayor en *C. calothyrsus* en comparación con el Caupí. El contenido de taninos condensados (TC) fue mayor en *C. calothyrsus* que en *F. macrophylla*.

Un resultado de este experimento que muy posiblemente influyó en las variables de respuesta medidas en los animales fue que los consumos de leguminosas con taninos fueron inferiores a lo ofrecido a pesar de que la oferta total de forraje fue baja (Cuadro 2). Como resultado de este menor consumo la proporción de leguminosa con taninos en la dieta fue de 10 y 15% en promedio y no de 15 y 30% como se había diseñado.

En general, el consumo de MO tendió a decrecer a medida que se incrementó el nivel de *Calliandra* y *Flemingia* de 10 a 15% en la dieta, siendo las diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) para los tratamientos con las leguminosas con taninos en comparación al control (gramínea + Caupí) (Cuadro 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias en consumo entre especies de leguminosas con taninos. Por otra parte, la digestibilidad aparente de la MO y FDA fue menor ( $P < 0.001$ ) en los tratamientos con los niveles más altos de leguminosas con taninos en la dieta en comparación al control. El consumo de

**Cuadro 1.** Análisis de la composición de los alimentos (%) y digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS)

	<i>B. dictyoneura</i>	<i>V. unguiculata</i>	<i>C. calothyrsus</i>	<i>F. macrophylla</i>
MO	91.2 ± 0.9	88.4 ± 0.6	91.6 ± 6.3	94.5 ± 1.5
PC	6.4 ± 0.8	19.2 ± 2.3	15.8 ± 0.4	18.7 ± 0.4
FDN	81.0 ± 1.9	59.9 ± 3.4	53.1 ± 9.5	60.3 ± 7.4
FDA	42.5 ± 1.7	30.3 ± 1.6	38.4 ± 5.3	36.6 ± 7.6
Taninos	-	-	29.1 ± 4.2	11.4 ± 3.0
DIVMS	58.3 ± 1.5	68.8 ± 1.4	30.6 ± 2.4	37.0 ± 1.7

**Cuadro 2.** Proporción de Gramínea, Caupí, Flemingia y Calliandra ofrecida y consumida por ovinos en jaulas metabólicas.

Tratamiento	Oferta (%)				Consumo (%)			
	Gramínea	Caupí	Calliandra	Flemingia	Gramínea	Caupí	Calliandra	Flemingia
T1	55	45			55	45		
T2	55	30	15		57	33	10	
T3	55	15	30		67	18	15	
T4	55	30		15	57	33		10
T5	55	15		30	67	18		15

N y la concentración de nitrógeno amoniacal en rumen también disminuyeron ( $P < 0.01$ ) con la inclusión de leguminosas con taninos, comparado con el control. El flujo de nitrógeno total al duodeno, aumentó ( $P < 0.01$ ) cuando en la dieta hubo un 10% de *C. calothyrsus*, lo cual no se observó con el mismo nivel de *F. macrophylla*. Fue también evidente que el flujo de N al duodeno, disminuyó ( $P < 0.01$ ) cuando el nivel de las dos leguminosas con taninos en la dieta fue de 15%. El nitrógeno de escape expresado como una proporción del consumo de N total no aumentó como se esperaba con el nivel de consumo de leguminosas con taninos ni la absorción aparente de nitrógeno (Cuadro 3).

## CONCLUSIONES

La ingestión de pequeñas cantidades de leguminosas con taninos en mezcla con una leguminosa sin taninos redujo el consumo de MO, PC y la digestibilidad de fibra en ovinos alimentados con una dieta basal de gramínea de baja calidad. Por otra parte, el consumo de leguminosas con taninos en niveles bajos no afectó en la forma esperada utilización de N. Fue así como se observó que la inclusión de leguminosas con taninos en el nivel más alto redujo los niveles de amonio ruminal, pero también redujo el flujo de N al duodeno con respecto al control. Se concluye que con los bajos niveles de consumo de las leguminosas con taninos que se incluyeron en las mezclas de leguminosas usadas para suplementar una

**Cuadro 3.** Consumo y utilización de nitrógeno en ovinos alimentados con una gramínea y Caupí, con *Flemingia macrophylla* o *Calliandra calothyrsus*.

Observaciones	Tratamientos <sup>1</sup>					Contrastes			
	T1	T2	T3	T4	T5	T2 vs T4	T3 vs T5	T1 vs T2,T4	T1 vs T3,T5
Consumo diario (g/kg PV <sup>0.75</sup> )									
MO	42.5	40.0	35.9	39.5	37.0	0.788	0.421	0.020	<0.001
Digestibilidad aparente (%)									
MO	63.0	60.2	60.3	62.3	59.8	0.074	0.658	0.094	0.006
FDA	63.9	57.9	59.6	61.8	59.2	0.026	0.812	0.009	0.004
Nitrógeno									
N amoniacal ruminal (mg/dL)	15.1	14.3	10.8	13.0	12.7	0.320	0.170	0.206	0.007
Consumo de N (g/d)	13.2	11.4	9.6	11.8	9.7	0.421	0.951	0.010	<0.001
N total al duodeno (g/d)	12.5	12.9	11.1	10.6	10.3	0.009	0.373	0.311	0.017
N de escape ruminal (% del consumo de N)	70.9	81.4	77.3	59.4	83.4	0.002	0.352	0.921	0.103
Absorción aparente de N (g/d)	7.6	8.4	6.6	6.3	6.3	0.014	0.637	0.656	0.087

<sup>1</sup>Valores en paréntesis son las proporciones de forraje en la dieta consumida:

- T1, gramínea 55% (55%) + Caupí 45% (45%);
- T2, gramínea 55% (57%) + Caupí 30% (33%) + Calliandra 15% (10%);
- T3, gramínea 55% (67%) + Caupí 15% (18%) + Calliandra 30% (15%);
- T4, gramínea 55% (57%) + Caupí 30% (33%) + Flemingia 15% (10%);
- T5, gramínea 55% (67%) + Caupí 15% (18%) + Flemingia 30% (15%).

gramínea de baja calidad no se observaron efectos positivos en consumo, digestión y flujos de N al intestino delgado de ovinos, como se esperaba.

#### LITERATURA CITADA

- Barahona, R., 1995. *Condensed tannins in tow tropical legumes: concentration, astringency and effects on ovines nutrition*. Tesis PhD, Dep. of Agric., University of Reading. 353 pp.
- Carulla, J.E., 1994. *Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tannins*. Tesis PhD, University of Nebraska, Lincoln, E.U.
- Fässler, O.M. y Lascano, C.E., 1995. The effect of mixtures of sun-dried tropical shrub legumes on intake and nitrogen balance by sheep. *Tropical Grasslands* **29**: 92-96.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B. y Barry, T.N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **58**: 321-329.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. y Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**: 3583-3597.
- Zinn R.A., y Owens F.N., 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Canadian Journal of Animal Science* **66**: 157-166.

## Valor como fertilizante del estiércol de ovinos alimentados con leguminosas con taninos

Tassilo Tiemann<sup>1</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup>, Idupulapati M. Rao<sup>2</sup>,  
Hans Dieter Hess<sup>3</sup>, y Carlos E. Lascano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza,  
ttiemann@inw.agrl.ethz.ch

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT),  
Cali, Colombia

<sup>3</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y Productos Lácteos, CH-  
1725 Posieux, Suiza

### INTRODUCCION

Los taninos son compuestos secundarios polifenólicos que forman complejos con muchas clases de sustancias orgánicas e inorgánicas. Existe evidencia que algunos de los enlaces de taninos con otros compuestos son reversibles y se disocian en el tracto posterior de los rumiantes, mientras que otros son irreversibles y por ende excretados en las heces. Es posible que parte de los complejos proteína-taninos excretados en las heces si sean degradados por microorganismos del suelo y por ende aporten N a las plantas. En este escrito se resumen los resultados de un ensayo en el que se evaluó el efecto de las heces de animales alimentados con mezclas de leguminosas con y sin taninos en la producción de biomasa de una gramínea.

### MATERIALES Y METODOS

Para realizar el ensayo se sembró el híbrido *Brachiaria* cv. Mulato II, en materas usando, un suelo colectado en Matazúl (Llanos Orientales, Colombia). El suelo usado es ácido e infértil (Oxisol) con un pH de 4.5, deficiente en P y

bases intercambiables y bajo en materia orgánica. El suelo fue esterilizado al vapor por 8 h y secado al aire. A cada matera se le adicionaron 4 kg de suelo. Las heces usadas en el ensayo se colectaron de 10 animales en jaulas metabólicas alimentados con 5 dietas (Cuadro 1).

El Mulato II utilizado como planta extractora fue sembrado por semillas en bandejas con arena en el invernadero. Cuando las plántulas tuvieron una altura de 5 cm y suficiente vigor se transplantaron cuidadosamente 3 plantas por matera. Las plantas se regaron cada 3 días y después de 56 días del transplante se cortaron para medir peso verde, materia seca (MS) y nitrógeno de la parte aérea.

Se usaron dos tandas de suelo, una tratada con microelementos (Zn (20 kg/ha), S (2 kg/ha), Cu (2 kg/ha), B (0.1 kg/ha), Mo (0.1 kg/ha)), y una sin fertilización de microelementos. Los tratamientos de fertilización nitrogenada aplicados a Mulato II se escogieron en tal forma de poder comparar el efecto de tres niveles de N (0, 20 y

**Cuadro 1.** Dietas ofrecidas a ovinos en jaulas metabólicas de los cuales se colectaron heces para medir su efecto como fertilizante.

Dieta	<i>Brachiaria humidicola</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Leguminosa taninífera
1	55%	45%	-
2	55%	30%	<i>Calliandra calothyrsus</i> 15%
3	55%	15%	<i>Calliandra calothyrsus</i> 30%
4	55%	30%	<i>Flemingia macrophylla</i> 15%
5	55%	15%	<i>Flemingia macrophylla</i> 30%

80 mg N/kg suelo). El N fue aplicado como urea o como heces en forma fraccionada (antes del trasplante y 20 días después) (Cuadro 2). La cantidad exacta de heces aplicadas se calculó basado en un análisis de N (Micro-Kjeldahl) para cada tratamiento.

**Cuadro 2.** Tratamientos de fertilización aplicados a Mulato II sembrado en materas.

Proveniencia de las heces	Sin microelementos	Con microelementos
	Sin fertilización de N	Sin fertilización de N
		urea 20 mg N
		urea 80 mg N
Dieta 1	heces 20 mg N	heces 20 mg N
Dieta 1	heces 80 mg N	heces 80 mg N
Dieta 2	heces 20 mg N	heces 20 mg N
Dieta 2	heces 80 mg N	heces 80 mg N
Dieta 3	heces 20 mg N	heces 20 mg N
Dieta 3	heces 80 mg N	heces 80 mg N
Dieta 4	heces 20 mg N	heces 20 mg N
Dieta 4	heces 80 mg N	heces 80 mg N
Dieta 5	heces 20 mg N	heces 20 mg N
Dieta 5	heces 80 mg N	heces 80 mg N

## RESULTADOS

La adición de los microelementos incrementó ( $P < 0.001$ ) la producción de MS de 23 a 34 g. pero la adición de las heces como fertilizante no mostró efectos claros. La producción de MS en el tratamiento con heces de animales alimentados con 30% Calliandra mostró los valores más altos (32 g) mientras que en el tratamiento con heces de animales alimentados con 30% Flemingia se observaron los valores más bajos (24 g). La

adición de 80 mg N en forma de heces resultó en más producción de biomasa (32 g) que la adición de 20 mg N (25 g).

Independiente del nivel de aplicación, la fertilización con heces no mostró efecto comparado con el tratamiento sólo con microelementos y sin adición de fuentes de nitrógeno. Sin embargo, la fertilización con altas concentraciones de urea (80 mg N/kg), de heces de animales alimentados con Vigna o con 15% de Calliandra mostró un rendimiento de biomasa seca igual a los tratamientos en el suelo con microelementos. En todos estos tratamientos la producción de MS fue más alta ( $P < 0.05$ ) que en el suelo sin microelementos y con aplicación de 20 mg N/kg en forma de heces provenientes de dietas con 15% de Calliandra o Flemingia o 30% de Flemingia. El tratamiento sin ningún tipo de fertilización mostró un rendimiento cerca de 0 y fue el más bajo de todos ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

El factor más limitante para la producción de biomasa en el Oxisol usado fue sin duda la falta de microelementos. La adición de altas concentraciones de nitrógeno fácilmente disponible (e.g. con urea o con heces de Vigna) puede compensar este efecto. Es destacable que altas concentraciones de heces de animales alimentados con 15% de Calliandra tienen el mismo efecto como heces con origen de Vigna. Los resultados muestran además que heces provenientes de animales alimentados con leguminosas taniníferas presentan un reducido valor como fertilizante lo que resulta en un rendimiento de biomasa significativamente menor.

## Producción de leche de vacas en pastoreo suplementadas con mezclas de leguminosas con y sin taninos

Laila Bernal<sup>1,2</sup>, Patricia Avila<sup>2</sup> y Carlos E. Lascano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Palmira, Colombia, [lcbernalb@palmira.unal.edu.co](mailto:lcbernalb@palmira.unal.edu.co)

<sup>2</sup>Proyecto de Gramíneas y Leguminosas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia

### INTRODUCCION

La producción de carne y leche en zonas tropicales tiene como base alimenticia pasturas con gramíneas nativas o introducidas, las cuales frecuentemente presentan baja disponibilidad de forraje y deficiencias de la proteína en la época seca (Lascano, 1996; Domínguez Bello y Escobar, 1997). Una alternativa que tienen los productores para minimizar los efectos de la época seca en vacas lecheras en pastoreo es la de recurrir a la suplementación con concentrados comerciales o la de suplementar follaje de leguminosas arbustivas (Lascano, 1996; Hess et al., 2003; Abreu, 2003). Con esta estrategia el pequeño productor puede disponer de alimento para la época seca producidos en su finca y de esa forma disminuir costos y obtener buenos rendimientos productivos. Se ha planteado que para maximizar el efecto de leguminosas suplementadas a vacas lecheras sería conveniente usar mezclas de leguminosas con y sin taninos. La racionalidad para proponer esta estrategia es que los taninos tienen la capacidad de reducir pérdidas de amonio en el rumen que se presentan cuando se suplementa leguminosas con N fácilmente degradable. Como resultado se aumenta el flujo de N al tracto posterior lo cual puede resultar en mayor absorción de N y por ende más producción de leche o carne. Para probar esta hipótesis se realizaron una serie de estudios in vitro e in vivo y cuyos resultados se presentan en este documento. Como parte de esta serie de estudios se diseñó un experimento con vacas lecheras en pastoreo en una gramínea de baja calidad suplementadas con mezclas de leguminosas con y sin taninos en diferentes

proporciones. Los resultados de este ensayo se resumen en este escrito.

### MATERIALES Y METODOS

Este ensayo se llevó a cabo en la estación experimental CIAT en Santander de Quilichao, Cauca, Colombia. Se seleccionaron 8 vacas lecheras tipo Holstein x Cebú, distribuidas en 4 tratamientos en un diseño Cuadrado Latino 4 x 4, con dos animales por secuencia. Las leguminosas empleadas fueron *Calliandra calothyrsus* (CIAT 22310) alta en taninos y *Vigna unguiculata* (Caupí; CIAT 1088/4, 288, 391, 9611 y 715) sin taninos medibles. Los tratamientos evaluados fueron: T1, *Calliandra calothyrsus* 100%; T2, *Vigna unguiculata* 100%; T3, *Vigna unguiculata*/*Calliandra calothyrsus* (67/33%); y T4, *Calliandra calothyrsus*/*Vigna unguiculata* (67/33%). Las leguminosas henificadas se suministraron a cada vaca en un nivel de suplementación del 1% de materia seca (MS) del peso vivo al momento del ordeño, dividiendo la oferta en dos raciones a las 5:00 y 13:00 horas. Al suplemento se le adicionaron 100 g de melaza y 50 g de sal mineralizada (10% P) al momento de que se suministró a los animales.

Las vacas pastorearon *Paspalum notatum* en periodo seco (1.02 mm de lluvia para todo el periodo experimental) con una disponibilidad de 983 kg de MS/ha. El área de pastoreo (3 ha) se dividió en dos parcelas, una para ajuste y la otra para medición. La carga animal promedio durante el experimento fue de 2.6 UA/ha con un sistema de pastoreo alterno 7/7 (7 días en el potrero de ajuste y 7 días en el

**Cuadro 1.** Consumo diario de henos de leguminosas con y sin taninos suplementados a vacas lecheras en pastoreo.

TRATAMIENTOS	Oferta (kg verde)	Consumo kg MS	Consumo g MS/kg PV	Consumo % de oferta
Heno de Calliandra 100%	4.2	1.2c <sup>1</sup>	2.8c	28.9
Heno de Calliandra/Caupí 67/33%	4.3	3.5a	8.2a	81.2
Heno de Calliandra/Caupí 33/67%	4.4	2.6b	6.0b	59.4
Heno de Caupí 100%	4.3	3.8a	8.7a	87.3

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

**Cuadro 2.** Producción promedia de leche corregida por grasa (LCG) y nivel de nitrógeno ureico en leche (NUL) en respuesta a la suplementación a vacas en pastoreo de henos de leguminosas con y sin taninos.

Tratamientos	LCG (kg)	NUL (mg/dL)
Heno de Calliandra 100%	3.6c <sup>1</sup>	3.7b
Heno de Calliandra/Caupí 67/33%	4.7b	4.5 <sup>a</sup>
Heno de Calliandra/Caupí 33/67%	4.4b	3.1b
Heno de Caupí 100%	5.3a	6.3 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencia significativa,  $P < 0.05$ .

potrero de medición) para una duración total del experimento de 56 días. Como variable de respuesta se midió la producción de leche diaria. Además se tomaron muestra de leche para determinar grasa por el método Babcock, sólidos totales con el método de desecación y la determinación de nitrógeno ureico en leche (NUL) por un kit comercial. Las vacas se pesaron al inicio y final del ensayo. Las variables de respuesta fueron sometidas a un análisis de varianza, utilizando un paquete estadístico SAS (versión 9.1).

## RESULTADOS

El consumo de materia seca fue mayor con el heno de Caupí 100% y el heno de Calliandra/Caupí 33/67%. Sin embargo, con los niveles mas altos de Calliandra en el suplemento el consumo de MS se redujo (Cuadro 1).

Los resultados de producción de leche por vaca corregida por grasa en respuesta a los tratamientos de suplementación se presentan en la Cuadro 2. La mayor producción de leche se obtuvo con la suplementación de solo Caupí y el menor nivel de producción se observó cuando

se suplementó solo Calliandra. Por otra parte, no se observaron diferencias en producción de leche cuando se mezcló Caupí con el nivel bajo y alto de Calliandra. La calidad de la leche no varió entre tratamientos para las variables grasa, sólidos totales y sólidos no grasos. Por otra parte, el NUL presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) debidas a tratamientos (Cuadro 2). El nivel promedio de NUL fue más alto con el suplemento de heno Caupí 100%, que con el de Calliandra 100%, lo cual refleja el grado de degradabilidad de la proteína de las leguminosas suplementadas. Sin embargo, las dos mezclas con diferentes niveles de Caupí y Calliandra no tuvieron el efecto en NUL que se hubiese esperado.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio mostraron que la inclusión de mezclas de leguminosas con y sin taninos en un suplemento para vacas lecheras en pastoreo redujo en 0.5 a 1 litro con respecto al control (heno de caupí) la producción diaria de leche de vacas pastoreando una pastura de baja calidad. Esto es consistente con la reducción significativa en leche (1.5 litros)

cuando se suplementó solo leguminosa con taninos. Se concluye que la estrategia de mezclar leguminosas con y sin taninos en diferentes proporciones para suplementar vacas en pastoreo tuvo un efecto negativo en producción de leche en comparación a cuando se suplementó con una leguminosa sin taninos y con proteína altamente degradable en el rumen, como es el caso del Caupí.

#### LITERATURA CITADA

- Abreu, A., Carulla, J.E., Lascano, C.E., Díaz, T.E., Kreuzer, M. y Hess, H.D., 2004. Effects of *Sapindus saponaria* fruits on ruminal fermentation and duodenal nitrogen flow of sheep fed a tropical grass diet with and without legume. *Journal of Animal Science* **82**: 1392-1400.
- Dominguez Bello, M.G. y Escobar, A., 1997. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. *Animal Feed Science and Technology* **69**: 91-102.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E. y Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 703-713.
- Lascano, C.E., 1996. Calidad nutritiva y utilización de *Cratylia argentea*. En: Potencial del Género *Cratylia* como leguminosas forrajeras. *Memorias del Taller de Trabajo sobre Cratylia*. 19 y 20 julio de 1995. Brasilia, D.F. Brasil. Centro Internacional de Agricultura Tropical: Cali. Colombia. pp. 83-97.

**Publicación CIAT No. 352**

**Proyecto de Forrajes Tropicales**

**Edición:**

Hans Dieter Hess  
Julia Gómez Quintero  
Carlos E. Lascano

**Producción:**

Julia Gómez Q. (diagramación)  
Hans Dieter Hess (diseño carátula)

**Impresión:**

Compuimagen, Palmira, Colombia

**Swiss Centre for International Agriculture  
Schweizerisches Zentrum für Internationale Landwirtschaft  
Centre Suisse pour l'Agriculture Internacionale**



ISBN: 958694087X