

UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN AGRICULTURA ALTERNATIVA MENCIÓN EN  
AGRICULTURA ECOLÓGICA

---

EFFECTO DEL ENSILADO DE CUATRO LEGUMINOSAS EN MEZCLA CON  
DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA FERMENTACION,  
CALIDAD NUTRITIVA Y PRODUCCION DE METANO

Michael López Herrera

Tesis presentada para optar por el título de Master Scientiae en Agricultura Alternativa con  
mención en Agricultura Ecológica

Campus Omar Dengo, Costa Rica

2017

**EFFECTO DEL ENSILADO DE CUATRO LEGUMINOSAS EN MEZCLA CON  
DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA CALIDAD  
NUTRITIVA Y EMISION DE METANO**

**Michael López Herrera**

## RESUMEN GENERAL

El objetivo de esta investigación fue determinar la calidad fermentativa, nutricional y la producción de metano *in vitro* de mezclas ensiladas de *Vigna unguiculata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana* con diferentes fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido y fruto de guineo cuadrado). Todos los análisis fueron realizados en el laboratorio de bromatología del CINA de la Universidad de Costa Rica entre 2015 y 2016, los materiales forrajeros fueron cosechados en la finca Vocaré ubicada en Upala, Costa Rica, se utilizaron dos edades de corte 40 días para las especies herbáceas y 75 días para las especies arbustivas. Los experimentos de calidad de ensilaje y fraccionamiento de la proteína constan de un diseño factorial 4x4 con 16 tratamientos, mientras que los experimentos de valor nutritivo y producción de metano tienen un diseño multifactorial 4x4x2 de 32 tratamientos. Los forrajes fueron cortados a un promedio de 5 cm y colocados en bolsas plásticas para ensilaje, en dichas bolsas se almacenaron dejándolos en condiciones anaeróbicas durante 50 días. A todos los tratamientos se les evaluaron las características de calidad organoléptica (Color, Olor y Textura) y química (pH, NH<sub>3</sub>/NT y AGV) para ensilajes, además se determinó el perfil nutricional de las mezclas forrajeras tanto frescas como ensiladas. Además se analizó el fraccionamiento de la proteína, para conocer el comportamiento potencial de estos materiales ensilados al ser utilizados en alimentación de rumiantes. Toda la información se tabuló y se analizó mediante un modelo ANOVA, además se realizó un análisis de componentes principales, correlaciones canónicas y correlación de Pearson, para detectar posibles relaciones entre la producción de metano y todas las variables analizadas. Se determinó que las mezclas ensiladas presentaron características físicas de calidad media a buena y que estas características son influenciadas por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos utilizada. Los valores de pH fluctuaron entre 4,5 y 5,8, además los valores de nitrógeno amoniacal variaron entre 4,3 y 14,6% NH<sub>3</sub>/NT, mientras que la concentración de ácidos orgánicos en los ensilados varió entre 0,8 y 6,5% MS para el ácido láctico, 2,5 y 6,9% MS para el ácido acético y 0,1 y 1,8% MS para el ácido butírico. Los tratamientos presentaron disminución en la concentración de materia seca y de los componentes de la fibra cuando se pasa de material fresco a ensilado, caso contrario la energía aumenta debido a una reducción de la FDA (1,0 – 18,5%), también potencialmente se afectaría el consumo voluntario de los animales estimado por cambios en la concentración de FDN (2,7 – 25,4%). El contenido de proteína cruda también disminuye debido a formación de nitrógeno amoniacal. De esta manera, los ensilados mostraron

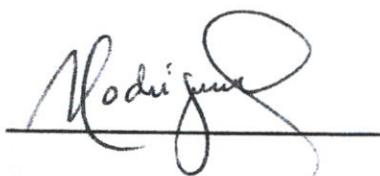
valores de PDR entre 30,6 y 60,4% PC y de PnDR entre 26,5 y 55,9% PC, aunque entre 9,9 y 24,0 % de la PnDR, pertenecen a la fracción C. La digestibilidad de la FDN afecta la producción de metano, aunque es mayor el efecto de los taninos en el forraje sobre esta variable. Así, los tratamientos que produjeron menos metano fueron los elaborados con Erythrina (12,57 L CH<sub>4</sub>/kg MSD), mientras que los de mayor producción fueron los de Vigna (16,21 L CH<sub>4</sub>/kg MSD) debido a diferencias en el contenido de taninos condensados en el forraje y mayor concentración de FDN digestible. La fuente de carbohidrato que redujo más la producción de metano fue el maíz (12,64 L CH<sub>4</sub>/kg MSD), en cambio los tratamientos que mayor cantidad de gas produjeron fueron los de fruto de guineo cuadrado (15,76 L CH<sub>4</sub>/kg MSD). Las mezclas forrajeras analizadas pueden proveer una adecuada cantidad de nutrimentos para animales, además pueden ser conservados y mantener una calidad física y química aceptable siempre y cuando no se utilicen fuentes de almidón como fuente de carbohidratos en la mezcla. Finalmente, tienen la capacidad de reducir la producción de metano debido a los taninos condensados en los forrajes y al almidón en las fuentes de carbohidratos, con respecto a otros forrajes tropicales.

## OVERALL ABSTRACT

The objective of this research was to determine the fermentation, nutritional quality and in vitro methane production of ensiled mixtures of *Vigna unguiculata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea* and *Erythrina poeppigiana* with different sources of carbohydrates (sugar cane molasses, dehydrated citrus pulp, ground corn and saba banana). All analyzes were carried out in the CINA bromatology laboratory of the University of Costa Rica between 2015 and 2016, fodder materials were harvested at the Vocaré farm located in Upala, Costa Rica, two species of cut age were used for 40 species Herbaceous and 75 days for shrub species. The silage quality and fractionation experiments of the protein consist of a 4x4 factorial design with 16 treatments, while the experiments of nutritive value and methane production have a multifactorial design 4x4x2 of 32 treatments. The forages were cut to an average of 5 cm and placed in plastic bags for silage, in these bags were stored leaving them in anaerobic conditions for 50 days. All the treatments were evaluated for organoleptic quality (Color, Odor and Texture) and chemical (pH, NH<sub>3</sub> / NT and AGV) for silage. In addition, the nutritional profile of both fresh and ensiled forage mixtures was evaluated. In addition, the fractionation of the protein was analyzed to know the potential behavior of these silage materials when used in feed of ruminants. All data were tabulated and analyzed using an ANOVA model. In addition, an analysis of major components, canonical correlations and Pearson correlation was performed to detect possible relationships between methane production and all variables analyzed. It was determined that the ensiled mixtures presented medium to good physical characteristics and that these characteristics are influenced by the interaction between the legume species and the carbohydrate source used. PH values fluctuated between 4.5 and 5.8, in addition the ammoniacal nitrogen values varied between 4.3 and 14.6% NH<sub>3</sub>/NT, while the organic acids concentration in the silages varied between 0.8 and 6.5% MS for lactic acid, 2.5 and 6.9% MS for acetic acid and 0.1 and 1.8% MS for butyric acid. The treatments showed a decrease in dry matter concentration and fiber components when moving from fresh material to silage, otherwise the energy increases due to a reduction of the FDA (1.0 - 18.5%), as well potentially affecting voluntary consumption of animals estimated by changes in NDF concentration (2.7 - 25.4%). The crude protein content also decreases due to the formation of ammonia nitrogen. Thus, the silages showed PDR values between 30.6 and 60.4% PC and NDR between 26.5 and 55.9% PC, although between 9.9 and 24.0% of the NDR were belonged to the fraction C. The digestibility of the NDF affects the production of methane, although the effect of the tannins in the forage on this variable is greater. Thus, the treatments that produced less methane were those made

with Erythrina (12.57 L CH<sub>4</sub>/kg MSD), while the ones with the highest production were Vigna (16.21 L CH<sub>4</sub>/kg MSD) due to differences in content of condensed tannins in the forage and higher concentration of digestible NDF. The source of carbohydrate that most reduced the production of methane was corn (12.64 L CH<sub>4</sub>/kg MSD), whereas the treatments that produced the largest amount of gas were those of saba banana (15.76 L CH<sub>4</sub>/kg MSD). The forage mixtures analyzed can provide an adequate amount of animal nutrients and can be preserved and maintain acceptable physical and chemical quality as long as starch sources are not used as a source of carbohydrate in the mixture. Finally, they have the ability to reduce methane production due to condensed tannins in forages and starch in carbohydrate sources, compared to other tropical forages.

## HOJA DE APROBACION



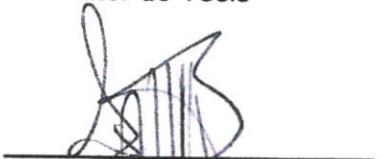
M.Sc. Jose Rodriguez Zelaya

Presidente del CCP



M.Sc. Augusto Rojas Bourrillon

Tutor de Tesis



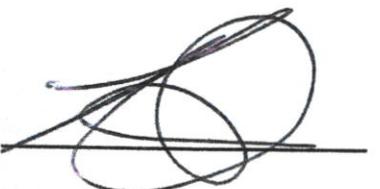
Dr. Johnny Montenegro Ballester" data-bbox="449 369 732 390"/>

Asesor de Tesis



M.Sc. Andrés Alpizar Naranjo

Asesor de Tesis



Dr. Luis Ovar" data-bbox="444 589 668 610"/>

Coordinador de la Maestría



Lic. Michael López Herrera

Sustentante

## **AGRADECIMIENTOS**

A Carmen Laura, mi compañera de viaje, por todo su apoyo emocional, los consejos tan atinados para cada situación, por todo el sacrificio y paciencia durante estos años de matrimonio y estudio. A mi hijo Gabriel por toda la energía que me transmitió en los momentos que más cansado me sentía, por toda la paciencia que un niño puede tenerle a un padre que no puede jugar tanto como ellos desean.

A Don Augusto Rojas gracias por estar ahí, como docente, consejero, compañero y amigo. Por creer en mi tanto personal como académicamente y ser una piedra angular en mi formación profesional.

A Doña Gabriela Soto, por su labor de coordinación de la Maestría, que siempre buscó la excelencia y como enriquecer nuestra formación. También le agradezco por todos los consejos y la habilitación de la Maestría.

Al Dr. Johnny Montenegro y al M.Sc. Andrés Alpizar, por sus consejos y sabia dirección en el desarrollo de este proyecto.

A mi amigo Ernesto Briceño y la Finca Agroecológica Vocaré con quien he podido trabajar en el desarrollo de investigación para la ganadería orgánica, muy agradecido por su ayuda y apoyo en lo que respecta a logística de investigación incluíd este trabajo.

Finalmente agradezco al resto de las personas involucradas o no, que hayan colaborado en la finalización de esta investigación.

## DEDICATORIA

A mi amada familia, por ser una fuente de apoyo incondicional a lo largo de estos dos años de estudio. Por alentarme a continuar y crecer tanto en lo personal como en lo profesional. Finalmente, por ser todo para mí, y la razón que impulsa cada una de mis acciones.

A Dios por estar ahí siempre...

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN GENERAL</b>	<b>III</b>
<b>OVERALL ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>HOJA DE APROBACION</b>	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>VIII</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE GENERAL</b>	<b>X</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>XIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>XV</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>XVI</b>
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes y justificación	1
1.2. Objetivos	1
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
<b>CAPITULO 2. MARCO TEORICO</b>	<b>5</b>
2.1. El uso de leguminosas en la alimentación animal	5
2.2. El uso de fuentes de carbohidratos en alimentación animal	6
2.2.1. Melaza	6
2.2.1. Pulpa de cítricos deshidratada	7
2.2.1. Maíz	7
2.2.1. Fruto de guineo cuadrado	8
2.3. El proceso de ensilaje	8
2.3.1. Factores que favorecen un adecuado proceso de ensilaje	8
2.3.1.1. Temperatura del proceso	8
2.3.1.2. Porcentaje de materia seca del material	9
2.3.1.3. Concentración de carbohidratos solubles en agua	9
2.3.1.4. Capacidad amortiguadora	9
2.3.1.5. Tamaño de partícula	10
2.3.2. Calidad del proceso de ensilaje	10
2.3.2.1. Potencial de hidrógeno	10
2.3.2.2. Nitrógeno amoniacal	11
2.3.2.3. Ácidos grasos volátiles	11
2.3.2.4. Características físicas	12
2.3.3. Tipos de fermentación	12
2.3.4. Etapas del proceso de ensilaje	19
2.3.4.1. Fase 1. Fase aeróbica	19
2.3.4.2. Fase 2. Fase de fermentación	19
2.3.4.3. Fase 3. Fase estable	19
2.3.4.4. Fase 4. Fase de deterioro aeróbico	20
2.4. Animales rumiantes y la metanogénesis en el rumen	20
2.5. La metanogénesis y las fuentes de alimento	22
2.6. La metanogénesis y el tipo de forraje	23
2.7. Estrategias para reducir emisiones de metano en el rumen	24
2.7.1. Uso de ionóforos	24
2.7.2. Uso de probióticos	25
2.7.3. Defaunación	26
2.7.4. Uso de grasas y aceites esenciales	27
2.7.5. Cambios en tipo de carbohidrato	29
2.7.6. Tipo de conservación y presentación del forraje	31

2.7.7. Selección de plantas con metabolitos secundarios	31
2.8. LITERATURA CONSULTADA	33
<b>CAPITULO 3. EFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS EN LA CALIDAD FÍSICA Y QUÍMICA DE MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>45</b>
3.1. RESUMEN	46
3.2. ABSTRACT	47
3.3. INTRODUCCION	48
3.4. MATERIALES Y METODOS	49
3.4.1. Ubicación del experimento	49
3.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas	49
3.4.3. Diseño experimental y tratamientos	50
3.4.4. Procedimiento experimental	50
3.4.5. Variables a evaluar	50
3.4.6. Análisis de la información	51
3.5. RESULTADOS Y DISCUSION	52
3.5.1. Características organolépticas de los materiales ensilados	52
3.5.1.1. Color	52
3.5.1.2. Olor	53
3.5.1.3. Textura	54
3.5.2. Características químicas del ensilaje	55
3.5.2.1. Potencial de hidrógeno	55
3.5.2.2. Nitrógeno amoniacal (NH <sub>3</sub> /NT)	57
3.5.2.3. Ácidos orgánicos de los ensilados	58
3.6. CONCLUSIONES	61
3.7. LITERATURA CITADA	63
<b>CAPITULO 4. EFECTO DE LA ESPECIE LEGUMINOSA, LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS Y EL PROCESO DEL FORRAJE EN EL VALOR NUTRICIONAL DE MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>66</b>
4.1. RESUMEN	67
4.2. ABSTRACT	68
4.3. INTRODUCCION	69
4.4. MATERIALES Y METODOS	70
4.4.1. Ubicación del experimento	70
4.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas	70
4.4.3. Diseño experimental y tratamientos	70
4.4.4. Procedimiento experimental	71
4.4.5. Variables a evaluar	71
4.4.6. Análisis de la información	72
4.5. RESULTADOS Y DISCUSION	72
4.5.1. Materia seca y componentes celulares	72
4.5.2. Componentes de la pared celular	77
4.5.3. Contenido energético de las mezclas	82
4.6. CONCLUSIONES	86
4.7. LITERATURA CITADA	87
<b>CAPITULO 5. EFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS SOBRE EL FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA EN MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>91</b>
5.1. RESUMEN	92
5.2. ABSTRACT	93
5.3. INTRODUCCION	94

5.4. MATERIALES Y METODOS	95
5.4.1. Ubicación del experimento	95
5.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas	95
5.4.3. Diseño experimental y tratamientos	96
5.4.4. Procedimiento experimental	96
5.4.5. Variables a evaluar	96
5.4.6. Análisis de la información	97
5.5. RESULTADOS Y DISCUSION	97
5.5.1. Nitrógeno no proteico (Fracción A)	97
5.5.2. Proteína verdadera (Fracciones B1, B2 y B3)	100
5.5.2.1. Fracción B1	100
5.5.2.2. Fracción B2	101
5.5.2.3. Fracción B3	102
5.5.3. Proteína indigestible (Fracción C)	103
5.5.4. Relación entre fracciones de la proteína cruda	104
5.5.4.1. Proteína degradable en el rumen	104
5.5.4.2. Proteína no degradable en el rumen	106
5.6. CONCLUSIONES	107
5.7. LITERATURA CITADA	108
<b>CAPITULO 6. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS, ESPECIE DE LEGUMINOSA Y PROCESO DEL FORRAJE; SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA FDN Y LA PRODUCCION DE METANO <i>IN VITRO</i></b>	<b>112</b>
6.1. RESUMEN	113
6.2. ABSTRACT	114
6.3. INTRODUCCION	115
6.4. MATERIALES Y METODOS	116
6.4.1. Ubicación del experimento	116
6.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas	116
6.4.3. Diseño experimental y tratamientos	117
6.4.4. Procedimiento experimental	117
6.4.5. Variables a evaluar	118
6.4.6. Análisis de la información	119
6.5. RESULTADOS Y DISCUSION	120
6.5.1. Digestibilidad de la FDN	120
6.5.2. Producción de metano <i>in vitro</i>	122
6.5.3. Estimación de la emisión de metano entérico	130
6.6. CONCLUSIONES	132
6.7. LITERATURA CITADA	133
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>141</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>144</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>CAPITULO 3. EFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS EN LA CALIDAD FÍSICA Y QUÍMICA DE MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>45</b>
Cuadro 1. Clasificación de los indicadores organolépticos de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	52
Cuadro 2. Valores de pH y nitrógeno amoniacal (NH <sub>3</sub> /NT) de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación y materia seca (MS) antes del ensilaje. San José, Costa Rica. 2016.	55
Cuadro 3. Concentración de ácidos orgánicos, en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	58
<b>CAPITULO 4. EFECTO DE LA ESPECIE LEGUMINOSA, LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS Y EL PROCESO DEL FORRAJE EN EL VALOR NUTRICIONAL DE MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>66</b>
Cuadro 1. Valores de materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas (CEN), de las mezclas, en forma fresca y a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	73
Cuadro 2. Fraccionamiento de los carbohidratos fibrosos y no fibrosos de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, en forma fresca, antes del ensilaje y a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016	78
Cuadro 3. Contenido energético en forma de total de nutrientes digestibles (TND), energía neta de lactancia 1x (EN <sub>L</sub> ) y energía neta de lactancia 3x (EN <sub>L3x</sub> ) de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, en forma fresca y a 50 días de fermentación San José, Costa Rica. 2016.	83
<b>CAPITULO 5. EFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS SOBRE EL FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA EN MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>91</b>
Cuadro 1. Contenido de proteína cruda (PC) y fraccionamiento de la proteína cruda en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	99
Cuadro 2. Contenido de proteína degradable en el rumen (PDR), proteína no degradable en el rumen (PnDR) y proteína indigestible (PI), en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	105
<b>CAPITULO 6. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS, ESPECIE DE LEGUMINOSA Y PROCESO DEL FORRAJE; SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA FDN Y LA PRODUCCION DE METANO IN VITRO</b>	<b>112</b>
Cuadro 1. Valores de fibra en detergente neutro, fibra en detergente neutro indigestible y fibra en detergente neutro digestible, de las mezclas forrajeras en forma fresca, antes del ensilaje y con 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	121
Cuadro 2. Producción de metano, concentración y proporción de los ácidos grasos volátiles de diferentes mezclas forrajeras a 24 horas de fermentación in vitro. San José, Costa Rica. 2016.	123

Cuadro 3. Resultado de metanálisis de investigaciones para determinar la concentración de taninos condensados en las leguminosas forrajeras analizadas. San José, Costa Rica. 2016.	125
Cuadro 4. Emisión de metano entérico estimada de las mezclas de leguminosas y fuentes de carbohidratos evaluadas, de acuerdo al nivel de producción y al peso de los animales. San José, Costa Rica. 2016.	131

## INDICE DE FIGURAS

<b>CAPITULO 2. MARCO TEORICO</b>	<b>5</b>
Figura 1. Reacciones de fermentación de la glucosa y la fructosa por las bacterias homofermentativas (productoras de A. Láctico)	13
Figura 2. Fermentación de la glucosa por bacterias homofermentativas que también son heterofermentativas (productoras de ácido acético y láctico).	15
Figura 3. Reacciones de fermentación de la fructosa por Bacterias homofermentativas que también son heterofermentativas (productoras de ácido acético y láctico).	16
Figura 4. Fermentación de la glucosa y el lactato en A. Butírico por influencia de Clostridia	18
<b>CAPITULO 3. EFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS EN LA CALIDAD FÍSICA Y QUÍMICA DE MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>45</b>
Figura 1. Proporciones de cada ácido orgánico en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.	59
<b>CAPITULO 4. EFECTO DE LA ESPECIE LEGUMINOSA, LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS Y EL PROCESO DEL FORRAJE EN EL VALOR NUTRICIONAL DE MEZCLAS PARA ENSILAJE</b>	<b>66</b>
Figura 1. Potencial productivo (por requerimiento de proteína) en kg de leche/vaca/día de los tratamientos evaluados comparados con ensilados de maíz y soya, de acuerdo al nivel de consumo de Materia verde (MV) (5, 10 y 15 kg MV/día). San José, Costa Rica 2016	76
Figura 2. Potencial productivo (por requerimiento de energía neta de lactancia 3x) en kg de leche/vaca/día de los tratamientos evaluados, comparado con ensilados de maíz y soya, de acuerdo al nivel de consumo de Materia verde (MV) (5, 10 y 15 kg MV/día). San José, Costa Rica 2016	85
<b>CAPITULO 6. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS, ESPECIE DE LEGUMINOSA Y PROCESO DEL FORRAJE; SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA FDN Y LA PRODUCCION DE METANO IN VITRO</b>	<b>112</b>
Figura 1. Comparación entre el promedio de producción de metano in vitro y el contenido de taninos condensados en las leguminosas forrajeras evaluadas. San José, Costa Rica. 2016	125
Figura 2. Producción de metano de las mezclas forrajeras ensiladas a 24 horas de fermentación <i>in vitro</i> . San José, Costa Rica. 2016	127
Figura 3. Concentración de ácidos grasos volátiles en el licor ruminal con 24 horas de fermentación in vitro, de acuerdo a la fuente de carbohidratos. San José, Costa Rica. 2016.	129

## ABREVIATURAS

AGV= Ácidos grasos volátiles

BPAL= Bacterias productoras de ácido láctico

CEL= Celulosa

CEN= Cenizas

CH<sub>4</sub>=Metano

CINA= Centro de Investigación en Nutrición Animal

CMS= Consumo de material seca

CNF= Carbohidratos no fibrosos

CO<sub>2</sub>= Dióxido de carbono

DDGS= Destilados de granos secos con solubles.

EE= Extracto etéreo

ENL= Energía neta de lactancia

ENL3x= Energía neta de lactancia expresada a tres veces el mantenimiento

FDA= Fibra detergente en ácido

FDN= Fibra detergente en neutro

H<sub>2</sub>= Hidrógeno

HEM= Hemicelulosa

LIG= Lignina

MF= Material fresco

MS= Materia seca

NH<sub>3</sub>/NT= Nitrógeno amoniacal sobre el nitrógeno total

PC= Proteína cruda

PDR= Proteína degradable en el rumen

pH= Potencial de hidrógeno

PI= Proteína indigestible

PIDA= Proteína ligada a la fibra detergente en ácido

PIDN= Proteína ligada a la fibra detergente en neutro

PnDR= Proteína no degradable en el rumen

PV= Peso vivo

TND= Total de nutrimentos digestibles

## **CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL**

### **1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

Los forrajes son la principal fuente de alimento de los animales rumiantes en Costa Rica, esto debido a que poseen menor precio que los alimentos balanceados lo que permite la reducción de los costos de producción de los derivados animales. No obstante su aporte de nutrimentos es menor, ya que poseen mayor contenido de humedad y fibra que los alimentos concentrados lo que repercute de manera negativa en la productividad de los sistemas nacionales.

Debido a lo anterior existen sistemas que utilizan alimentos balanceados para llenar los requerimientos de los animales, aunque esto incrementa los costos de producción. Pese a que el precio de las materias primas utilizadas para la elaboración de concentrados han tendido al alza, lo que representa un desafío para los productores. Por esta razón se ha realizado investigación en el desarrollo de alternativas al uso de alimentos balanceados, sobretodo el uso de subproductos agrícolas y de leguminosas forrajeras.

El uso de forrajes de alta calidad supone una herramienta para mejorar la productividad, también conocer la calidad nutricional de estos materiales resulta relevante cuando se busca llenar los requerimientos de los animales de producción. A pesar de esto no es suficiente conocer y mejorar la calidad de los forrajes consumidos por los animales, sino que este material debe estar disponible durante todo el año para mantener un promedio de producción estable. Es en este punto donde técnicas de conservación de forrajes como el ensilaje adquieren importancia.

El ensilaje es una técnica de conservación de forraje por vía húmeda, que consiste en almacenar forrajes en estado verde en ausencia de oxígeno, donde ocurren transformaciones químicas y físicas que definen su calidad (Hiriart, 2008). El ensilaje permite mantener la disponibilidad del componente forrajero durante la estación seca o lluviosa, condiciones que reducen el rendimiento de las pasturas por hectárea (Gutierrez et al., 2003; López-Herrera et al., 2009). Además, el ensilaje permite preservar desechos agrícolas altos en carbohidratos (>20% carbohidratos no fibrosos), como es el caso del pejibaye (fruto), pulpa de cítricos, yuca, subproductos de piña y camote (Gutiérrez et al., 2003; López-Herrera et al., 2014).

Otro gran desafío de los sistemas de producción de rumiantes es la reducción del impacto ambiental, sobre todo la reducción de la emisión de metano. De acuerdo a Lascano y Cárdenas (2010), los rumiantes producen entre 21 y 25% del total de emisiones de metano antropogénico. Aunque en Costa Rica se ha determinado que la fermentación entérica representa el 52% del total del metano generado por actividades humanas como la producción de energía y el manejo de los residuos (CNUCC, 2012), por lo que es necesario utilizar tecnologías que permitan una reducción en las emisiones sin afectar la producción y rentabilidad de las explotaciones.

En Costa Rica la emisión de metano entérico representa 82.2% de las emisiones del sector agropecuario (MINAE-IMN, 2014), mientras que en países como: Zambia (2014), México (INE-SEMARNAT, 2009) y Panamá (ANAM, 2011); alcanza valores de 46,3%, 96,4% y 81,2% del sector agropecuario, respectivamente. En países de clima templado como Argentina (SAyDS, 2007), Uruguay (MVOTMA, 2010) y Nueva Zelanda (MFE, 2011), la fermentación entérica representa 96,6%, 93,9% y 62,1%, correspondientemente. Esto constituye un reto para el sector ganadero en un momento donde se busca el desarrollo de sistemas de producción que sean eficientes y ambientalmente amigables en el tiempo.

A pesar de esto, la metanogénesis constituye un mecanismo natural fundamental para eliminación del hidrógeno ( $H_2$ ) del rumen (Kasuya y Takahashi, 2010). De esta manera, conforme aumenta el consumo de pastos y forrajes, se induce un aumento de pH, que favorece poblaciones de bacterias con capacidad para degradar los carbohidratos fibrosos y durante este proceso de descomposición se incrementa la producción de ácido acético en el rumen (Cruz y Sánchez, 2000). Como consecuencia de lo anterior, aumenta la cantidad de  $CO_2$  y  $H^+$  y el dióxido de carbono es reducido a metano, lo que permite su eliminación mediante el eructo (Jiao et al., 2013). A pesar de su necesidad, este proceso constituye una pérdida en la eficiencia alimenticia del rumiante (Pellikaan et al., 2011), esto debido a una incapacidad para aprovechar toda la energía consumida; de acuerdo a Mitsumori y Sun (2008) esta pérdida puede oscilar entre 2 – 12%.

En investigaciones realizadas en Brasil, utilizando pasturas tropicales, las emisiones diarias de metano en animales Nelore de  $402 \pm 51,6$  kg variaron entre 132,7 y 138,3 g  $CH_4$ /día (Nascimento, 2007) al utilizar heno de *Brachiaria brizantha* con diferentes estados de maduración y alimento balanceado. Mientras que en la investigación de Pedreira et al., (2009) se estimó la emisión de los animales de acuerdo a su estado fisiológico y grupo racial, lo que proporciona una idea del comportamiento de las emisiones, de esta manera los animales de raza Holstein emiten más metano (299,3 g  $CH_4$ /día) que los animales cruzados

(Holstein  $\frac{3}{4}$  x Gir (Zebu)  $\frac{1}{4}$ ) (264,2 g CH<sub>4</sub>/día). Además, que las vacas en producción (353,8 g CH<sub>4</sub>/día) emiten más que vacas secas (268,8 g CH<sub>4</sub>/día) y novillas (222,6 g CH<sub>4</sub>/día), por nivel de consumo y tipo de alimento consumido.

Según Goel y Makkar (2012) las pérdidas de energía debido a la metanogénesis son mayores en sistemas tropicales, ya que los forrajes poseen mayor contenido de fibra y lignina, con menor contenido de carbohidratos no fibrosos con respecto a forrajes de clima templado. Esta afirmación es respaldada por el estudio de Archiméde et al., (2011) quienes indican que, los pastos C4 (más altos en fibra y lignina), comunes en climas tropicales aumentan la producción de metano ruminal con respecto a pastos C3, provenientes de climas templados.

Archiméde et al., (2011) también señalan que, el uso de leguminosas tropicales reduce las emisiones de metano con respecto a los pastos C4, pero que no existen diferencias con respecto a los C3. Este efecto reductor de las leguminosas tropicales sobre la metanogénesis en el rumen se debe principalmente a la concentración de taninos en la planta y principalmente los taninos condensados (Williams et al., 2011), ya que reducen la disponibilidad de H<sub>2</sub> (Hook et al., 2010), reducen la digestión de la fibra (De Oliveira et al., 2007) e inhiben el crecimiento y actividad de los microorganismos metanogénicos (Bouchard, 2012).

Esta investigación busca relaciona el efecto de las fuentes de carbohidratos, la especie de leguminosas y el proceso de ensilaje en la calidad del proceso de fermentación durante la conservación del material, los cambios en la composición nutricional y su impacto sobre la producción de metano in vitro. Para este fin se desarrollaron cuatro capítulos en formato de artículo científico donde se concluyen todas los cambios importantes y relaciones entre variables que permiten señalar un punto de partida para líneas de investigación en las ramas de nutrición forrajes y cambio climático, también se pretende la publicación de todos los capítulos en revistas científicas.

## 1.2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

### 1.2.1. *Objetivo general*

- Determinar el efecto de diferentes especies de leguminosas y de fuentes de carbohidratos en la calidad del ensilaje, de acuerdo a la fermentación, valor nutricional y la producción de metano *in vitro*.

### 1.2.2. *Objetivos específicos:*

- Determinar la calidad química y física de diferentes especies de leguminosas ensiladas en mezcla con distintas fuentes de carbohidratos, para utilizarlas como indicador de la capacidad de su conservación mediante el ensilaje.
- Determinar las diferentes fracciones de la proteína de los ensilados, para conocer el potencial aprovechamiento de esta fracción en la digestión del rumiante.
- Determinar la composición bromatológica del ensilado de diferentes leguminosas en mezcla con distintas fuentes de carbohidratos, para relacionar las variables nutricionales con la emisión de metano.
- Determinar la producción de metano *in vitro* de diferentes especies de leguminosas ensiladas en mezcla con fuentes de carbohidratos.

## CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. El uso de leguminosas en la alimentación animal

El uso de especies arbóreas y arbustivas leguminosas como complemento alimenticio de dietas en base a pastos es una actividad común en América Latina, África y Australia (Devendra, 1995). El uso de leguminosas permite aumentar la cantidad de proteína, ya que posee mayor concentración de esta fracción con respecto al pasto utilizado como base de la dieta (Holmann y Lascano, 2001).

Las concentraciones de proteína de los árboles utilizados tradicionalmente en la alimentación de rumiantes presentan niveles de 12 a 30%, valores altos en comparación con pastos maduros que oscilan entre 3 y 10% (Devendra y Pezo, 2001). La digestibilidad de estos materiales está muy relacionada con la proporción y grado de lignificación de las paredes celulares (fibra) así como de la presencia de compuestos secundarios, principalmente taninos (Flores et al., 1998).

El uso de leguminosas en los sistemas de producción del trópico, se ha extendido, como una estrategia para reducir el uso de alimentos balanceados de alto costo (Tobía et al., 2004). Se plantean el uso de las leguminosas con sistemas de corte y acarreo, en sistemas silvopastoriles: como bancos de proteína o cercas vivas (Pezo e Ibrahim, 1998), aunque también se utilizan plantaciones de leguminosas forrajeras, en monocultivo o asociadas para conservar mediante la técnica del ensilaje (Tobía et al., 2004).

En el país se han realizado trabajos utilizando ensilajes de soya para alimentación de ganado lechero, en ellos se determinó que se puede sustituir hasta 13 % del alimento balanceado sin afectar la producción de los animales (Tobía et al., 2004). También se ha trabajado en el uso de asociaciones con maíz como una alternativa para mejorar el contenido de proteína y aumentar la producción de biomasa por hectárea de este forraje, Castillo et al., (2009) obtuvieron ensilajes de buena calidad nutricional (9-10% PC y 70-80% DIVMS) para alimentación de rumiantes, al asociar maíz con *Vigna* (*Vigna radiata*) en proporciones 70:30 y 60:40. Igualmente WingChing y Rojas (2005) obtuvieron ensilados de maní forrajero (*Arachis pinto*) sin deshidratar con niveles desde: 18,82 – 23,19% de materia seca y 18,86 – 21,20% de proteína, con edades de corte de 8 y 12 semanas.

También, se ha estimulado el uso de la *Cratylia* (*Cratylia argentea*), de acuerdo a Lascano (1995) es una leguminosa que posee gran adaptación a la sequía y buena

capacidad de rebrote, además produce aceptable cantidad de semillas y rápido establecimiento con las condiciones apropiadas. De acuerdo a López-Herrera y Briceño-Arguedas (2016), la *Cratylia* posee 18,21 – 26,59% de materia seca, 13,1 – 19,9% de proteína cruda y 45,6 – 57,8% de digestibilidad *in vitro* de la materia seca, cuando se cosecha entre los 60 – 90 días de rebrote.

Asimismo, se evaluó el uso de poro (*Erythrina* sp.) como suplemento proteico en animales en base a pastoreo, además se utilizó frutos verdes de banano como fuente energética. Se pudo determinar ganancias de peso vivo mayores a 140 g PV/animal/día entre novillos ramoneando poro en bancos de proteína y animales en pastoreo exclusivo de pasto Estrella africana (*Cynodon nlemfluencis*), demostrando el potencial para mejorar la productividad animal en sistemas tradicionales de producción ganadera con la utilización de arbóreas (Clavero, 2011).

## **2.2. El uso de fuentes de carbohidratos en alimentación animal**

### *2.2.1. Melaza*

La melaza es un líquido denso y negruzco obtenido como subproducto de la producción del azúcar a partir de la caña de azúcar, aunque también puede ser obtenida de otros cultivos, como la remolacha azucarera. Se considera una fuente energía y sus compuestos principales son los azúcares (principalmente sacarosa), los cuales alcanzan valores mayores a 60% de la materia seca por lo que ayudan a mejorar la palatabilidad de los alimentos para animales (Church et al., 2003).

Experimentos en ensilajes colocan la melaza como un estimulante de la fermentación, ya que aumenta la materia seca, promueve la proliferación de bacterias productoras de ácido láctico y en consecuencia incrementa la producción de lactato durante el ensilaje (Bautista-Trujillo et al., 2009). Se recomienda para utilizar en forrajes con bajo contenido de azúcares como las leguminosas y pastos maduros, aunque la dosis recomendada oscila entre 4 – 10% del peso de la masa a ensilar (McDonald, 1981; Hiriart, 2008).

### 2.2.1. Pulpa de cítricos deshidratada

La pulpa de cítricos es el subproducto obtenido de la industria de jugos de cítricos, está constituido principalmente por las cáscaras, semillas y la pulpa, aunque pueden llevar algunos frutos de desecho (Church et al., 2003). Este material puede utilizarse en forma fresca, ensilada o deshidratada, en este último se agrega óxido o hidróxido de calcio a fin de modificar el pH y facilitar el proceso, por lo que su contenido de calcio puede variar de acuerdo a cuanto calcio se haya agregado (Bampidis y Robinson, 2006).

La pulpa de cítricos deshidratada tiene un alto contenido de materia seca (aproximadamente 87%), además contienen baja proteína (7% de la materia seca). En cuanto a las fracciones de los carbohidratos la pulpa de cítricos posee 0,5% de la materia seca de almidón y 22,5% de pectinas (Bampidis y Robinson, 2006). Los niveles de azúcares oscilan entre 22,8 – 24,2%, aunque pueden ser menores si no se agregan las melazas al material deshidratado durante la manufactura (Mirzaei-Aghsaghali y Maheri-Sis, 2008). Este material se utiliza en ensilajes como aditivo para aumentar la cantidad de materia seca en la mezcla a conservar, además permite reducir pH, nitrógeno amoniacal y aumentar la concentración de lactato en el ensilado (McDonald 1981). En el trabajo de López-Herrera et al., (2009) se determinó que niveles mayores de 10% de inclusión de pulpa de cítricos deshidratada en ensilados de rastrojos de piña permiten una adecuada conservación del forraje.

### 2.2.1. Maíz

El grano de maíz (*Zea mays*) es uno de los principales ingredientes de los alimentos balanceados, es el grano de cereal de mayor valor energético, debido a su alto contenido en almidón, grasa y su bajo nivel de fibra (62% almidón, 3,5% extracto etéreo y 10% fibra detergente neutro) (Church et al., 2003). La fermentabilidad ruminal del almidón es limitada (60%), por lo que tiene un componente importante de sobrepaso al intestino delgado también es posible mejorar la digestibilidad total del almidón con la molienda del grano.

En ensilajes el grano de maíz ha sido utilizado en niveles de hasta 20% del total de la masa forrajera a conservar, sin embargo para las bacterias productoras de ácido láctico no es posible degradar polisacáridos como el almidón, que son dominantes en el maíz (McDonald 1981).

### *2.2.1. Fruto de guineo cuadrado*

El guineo cuadrado es una musácea que proviene de un híbrido triploide del grupo ABB, con mayores características de la especie *Musa balbisiana* (Mohapatra et al., 2010). Los frutos de musáceas han sido muy utilizados en la alimentación de animales rumiantes, debido a que se consideran fuentes de energía concentrada en forma de almidón (Yitbarek y Tamir, 2014). El contenido de almidón en los frutos de musáceas es variable entre las diferentes variedades (Mota et al., 2000; Dufour et al., 2009), sin embargo puede ser tan alto como 85% de la materia seca (Ravi y Mustaffa, 2013).

Este almidón puede ser resistente a la fermentación ruminal, esta resistencia está determinada por el contenido de amilosa en la cadena de almidón, sin embargo esta resistencia a la degradación también varía entre especies por lo que se deben analizar todas las especies utilizadas en alimentación animal para conocer su comportamiento en el sistema digestivo de los rumiantes (Lehmann et al., 2002; Sagilata et al., 2006; Bello-Lara et al., 2014).

## **2.3. El proceso de ensilaje**

La conservación de alimentos en forma de ensilaje es una herramienta de manejo que permite a los productores conservar recursos alimenticios (forrajes, residuos de cosecha, productos agroindustriales) para satisfacer la demanda alimenticia del ganado (Wattiaux, 1999) en las épocas de menor disponibilidad de alimentos (Hiriart, 2008).

Este proceso se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas (Elferink et al., 2005), favorecida por el valor de pH inicial, capacidad buffer inicial del forraje, temperatura, contenido de bacterias, contenido de carbohidratos solubles, el contenido de materia seca y el volumen de aire por volumen de material (Moore y Peterson, 1995).

### *2.3.1. Factores que favorecen un adecuado proceso de ensilaje*

#### 2.3.1.1. Temperatura del proceso

Los ensilajes de alta calidad han presentado temperaturas de hasta 32° C grados, sin embargo se espera que todos los ensilajes se encuentren entre 20 y 30° C grados, la temperatura ideal es de 23° C grados, ya que, provee el ambiente propicio para el

crecimiento de las bacterias productoras de ácido láctico (BPAL) y una adecuada tasa de respiración en la primera fase del ensilaje (Muck, 1988; Hiriart, 2008). Una temperatura mayor de 37° C grados en el silo estimula el crecimiento de bacterias clostridiales (Moore y Peterson, 1995).

#### 2.3.1.2. Porcentaje de materia seca (MS) del material

Los contenidos de materia seca en los materiales a ensilar para optimizar el proceso fermentativo deben de estar entre 35 y 55% (McDonald, 1981), valores menores provocan la descomposición del material por inadecuada fermentación producto de un efecto de dilución y pérdida de los carbohidratos presentes (Muck ,1988; Moore y Peterson, 1995). Por otro lado, valores mayores a 55% MS, el material no permite la adecuada compactación, lo que aumenta el nivel de oxígeno en el silo, provocando un mayor consumo de carbohidratos solubles, reduciendo la capacidad de preservarse (McDonald, 1981; Hiriart, 2008).

#### 2.3.1.3. Concentración de carbohidratos solubles en agua

El proceso de ensilaje ocurre debido a la fermentación de los carbohidratos solubles en agua (o carbohidratos solubles) por parte de la microflora epífita en los forrajes, en particular las BPAL (Davies et al., 1998). Fisher y Burns (1987), indican en su investigación que, el nivel mínimo de carbohidratos solubles en el forraje a ensilar oscila entre 60 y 80 g/kg de MS. Utilizando un criterio distinto, Vargas (1979) señala que, el nivel de carbohidratos no fibrosos del material a ensilar debe ser mayor al 10% de la materia seca para una buena fermentación.

#### 2.3.1.4. Capacidad amortiguadora

Según Giger-Reverdin et al., (2002), la acción buffer se define como la habilidad de una solución a resistir un cambio en el pH ya sea por la adición o por la extracción de un ácido o un álcali. Así mismo McDonald y Henderson (1962) describen la capacidad amortiguadora de los alimentos como la habilidad de cierta cantidad de un alimento a resistir un cambio en el pH después de la adición de una solución ácida o una solución básica, sea esta débil o fuerte. Al optimizarse el proceso de ensilaje por una rápida reducción del pH, conocer la capacidad amortiguadora de los forrajes es una herramienta útil para obtener un adecuado ensilaje (Giger-Reverdin et al., 2002).

Durante la fermentación del material se exponen los compuestos nitrogenados como las proteínas y los ácidos orgánicos lo que incrementa la capacidad amortiguadora del material en el silo (McDonald, 1981). Por su parte, Moore y Peterson (1995), señalan que las leguminosas poseen mayor capacidad buffer que las gramíneas por su alto contenido de proteína, además comentan que fuertes fertilizaciones con potasio pueden incrementar la capacidad buffer del material, especialmente en leguminosas como la alfalfa. Igualmente, Playne y McDonald (1966) señalan que la capacidad amortiguadora es influenciada por: los aniones tanto orgánicos como inorgánicos (70 – 80%), las proteínas de la planta (10 – 12%) y los residuos de fibra (10 – 12%), por lo que se debería conocer la concentración de cada componente del forraje para obtener ensilajes de buena calidad.

#### 2.3.1.5. Tamaño de partícula

Jones et al., (2004) consideran que para que haya un adecuado proceso de ensilaje el tamaño de partícula del material debe ser de 3/8 a 3/4 de pulgada (de 0,96 a 1,92 cm.) en el ensilado de maíz y de 3/8 a 1/2 pulgada (0,96 a 1,28 cm.) en ensilado de alfalfa.

#### *2.3.2. Calidad del proceso de ensilaje*

Para la determinación de la calidad del proceso de ensilaje se pueden utilizar análisis químicos y/o físicos, que involucran el uso de tecnología o el uso de la percepción sensorial. En la parte química se realizan los análisis: pH, contenido de nitrógeno amoniacal y concentración de ácidos grasos volátiles. Mientras que en la evaluación física se utilizan pruebas sensoriales como: color, olor y textura (Hiriart, 2008).

##### 2.3.2.1. Potencial de hidrógeno (pH)

La meta durante el proceso de ensilaje es reducir el pH del forraje lo más rápido posible (Davies et al., 1998). Con esta reducción en el pH se detienen: la proliferación y el metabolismo de las bacterias: clostridium, enterobacterias y levaduras, estos microorganismos descomponen el material a conservar, o poseen procesos enzimáticos y fermentativos no acordes para la conservación por medio de ensilaje (Moore y Peterson, 1995).

De acuerdo a Davis et al., (1998) e Hiriart (2008), la caída del pH debe ser lo más rápido posible a <4,2, aunque se prefiere que sea menor de 4,0, para producir un ensilaje estable en corto tiempo. Por su parte, Ojeda et al., (1991) señalan que un buen ensilaje

posee un pH entre 3,7 – 4,2, lo que coincide con la afirmación anterior. Sin embargo, cuando se utilizan forrajes con alto contenido de humedad se dificulta la reducción del pH del forraje, por lo que se aceptan como de calidad moderada los ensilados con valores de pH de 4,5 (McDonald, 1981).

#### 2.3.2.2. Nitrógeno amoniacal

La presencia de amoníaco en los ensilajes está condicionada al contenido de los aminoácidos, los nitratos presentes del forraje y a la degradación debida al metabolismo de las bacterias durante el ensilaje. Su concentración da una idea de la proporción de las proteínas que se han desdoblado durante proceso de ensilaje, cuando este se expresa como porcentaje del nitrógeno total (Hiriart, 2008), esta cantidad de proteínas desdobladas, puede ser alto o bajo de acuerdo a la calidad de la fermentación en el silo (McDonald, 1981).

Los valores esperados de nitrógeno amoniacal para un ensilado de buena calidad varían según el tipo de forraje (Jones et al., 2004), sin embargo varios autores coinciden, en lo que se considera un criterio de buena calidad y uno de mala calidad, por ejemplo, Betancourt et al., (2005) indican que en ensilajes bien conservados la concentración de nitrógeno amoniacal con respecto al nitrógeno total debe ser menor a 7%, nivel que coincide con el reportado por Ojeda et al.(1991) y Peña y Del Pozo (1992). Por su parte, Moreno (1977) indica que concentraciones menores al 11% nitrógeno amoniacal se califican como ensilajes aceptables, mientras que ensilajes de mala calidad se relacionan a valores superiores al 15% nitrógeno amoniacal.

#### 2.3.2.3. Ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles, son los ácidos orgánicos que se producen por el metabolismo de las bacterias durante el ensilaje (McDonald, 1981). Aunque se forman muchos tipos distintos de ácidos orgánicos producto de la fermentación de los forrajes, durante el ensilaje (Moore y Peterson, 1995), los ácidos que se producen en mayor cantidad, que determinan la calidad final del ensilaje y por ende la calidad del material conservado son: el ácido láctico, el ácido acético y el ácido butírico (Hiriart, 2008).

De esta manera, los ensilajes de buena calidad tienen niveles altos de ácido láctico (>2,0% MS), ya que por la alta acidez que induce en el medio, permite cumplir una acción bactericida, conservando mejor el ensilaje (Betancourt et al., 2005). De esta manera, en un ensilaje considerado de buena calidad se obtendrán concentraciones de ácido láctico

mayores a 2% MS, pero con concentraciones de los ácidos acético y butírico menores de 1,8% MS y 0,1% MS, respectivamente (Esperance et al., 1981; Ojeda et al., 1991). En el caso de forrajes que provengan de ensilajes de mala calidad los contenidos de AGV serán menores de 1,5% MS para el ácido láctico, hasta 6% MS para el ácido acético y mayores de 1 y hasta 2% (Ojeda et al., 1991; Betancourt et al., 2005).

#### 2.3.2.4. Características físicas

Los criterios físicos utilizados para identificar un ensilado de buena calidad son: color, olor y buena textura (Betancourt et al., 2005). Estos mismos autores señalan que, el color puede fluctuar desde verde, donde se califica como excelente hasta café oscuro (indeseable). El olor debe ser agradable (alta concentración de ácido láctico), pero como indicativo de ineficiencia en el proceso, se califican ensilados con olor avinagrado (acético) hasta el olor pútrido, producto de una mala fermentación (butírico).

Con respecto a la textura se puede definir como la facilidad para separar los componentes del ensilado, en cuyo caso se utiliza la calificación deseable; cuando los componentes de la mezcla se separan con facilidad. Mientras que la calificación no deseable se aplica cuando los materiales se mantienen adheridos entre sí, inclusive se perciben jabonosos al tacto. Todos los criterios pueden ser sometidos a una escala de valores tal y como se ha hecho en otras investigaciones de ensilajes (Elizondo-Salazar y Campos-Granados, 2014).

#### *2.3.3. Tipos de fermentación*

Las BPAL constituyen el grupo de microorganismos deseables en el proceso de ensilaje, ya que tienen la habilidad de fermentar los carbohidratos solubles generando el ácido láctico como principal producto, siendo este ácido el que más contribuye a la conservación del forraje (Moore y Peterson, 1995). Estas bacterias se encuentran como microorganismos epífitos en tejidos vegetales frescos e incluyen los géneros *Lactobacillus sp*, *Pediococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Lactococcus sp* y *Streptococcus sp* (Pagán, 2006).

Dependiendo de la cantidad inicial de las BPAL en el material y las condiciones fermentativas que predominen durante el proceso se producen dos tipos de fermentación: la homofermentativa y la heterofermentativa (Moore y Peterson, 1995). Los procesos homofermentativos, a su vez, se subdividen en homofermentativos obligados (Figura 1) y homofermentadoras facultativas. Las bacterias homofermentativas obligadas son capaces

de degradar hexosas pero no pentosas y cuyo producto de fermentación es mayormente ácido láctico, este tipo de bacterias son las más deseables durante el proceso de fermentación por su alta producción de ácido láctico.

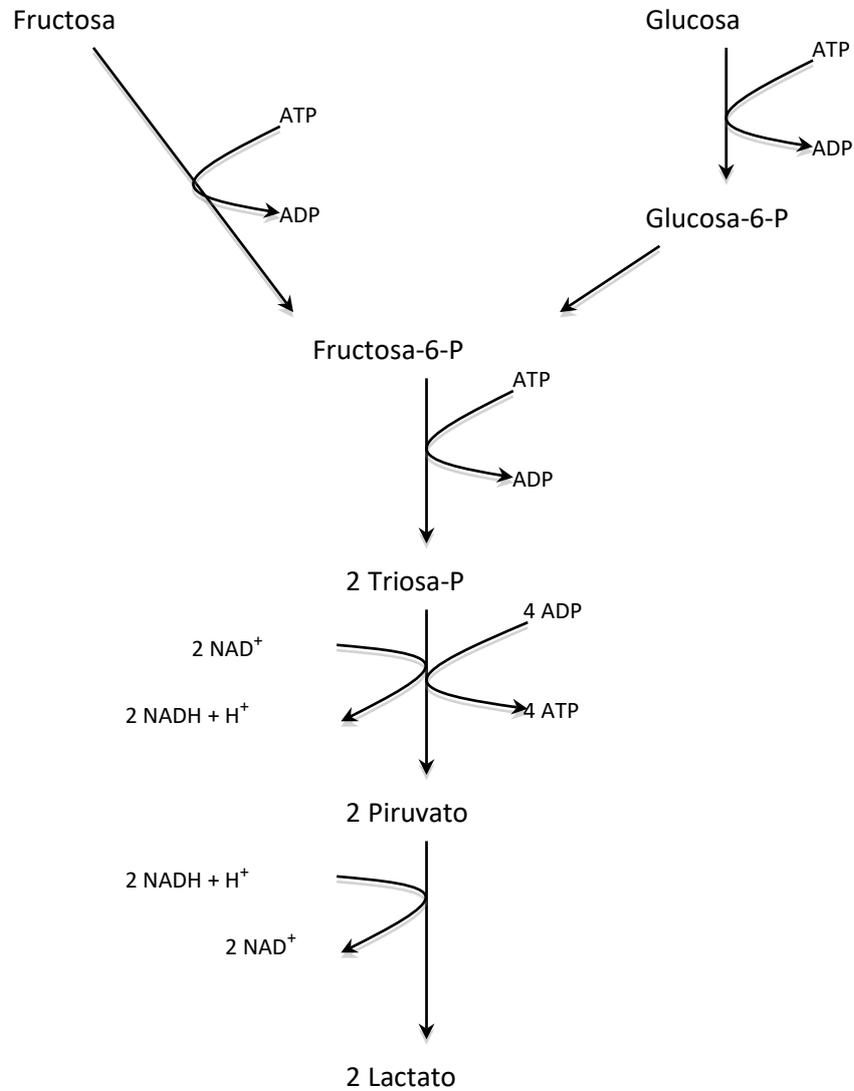


Figura 1. Reacciones de fermentación de la glucosa y la fructosa por las bacterias homofermentativas (productoras de A. Láctico)  
Adaptado de McDonald (1981)

Mientras que las bacterias homofermentadoras facultativas también pueden producir ácido láctico a partir de las hexosas, aunque pueden degradar algunas pentosas con producción de ácido láctico, ácido acético y etanol (McDonald, 1981) (Figuras 2 y 3). De la misma manera que las bacterias homofermentadoras facultativas, las BPAL heterofermentativas degradan tanto hexosas y pentosas, generando cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético y etanol (Jones et al., 2004) (Figuras 2 y 3).

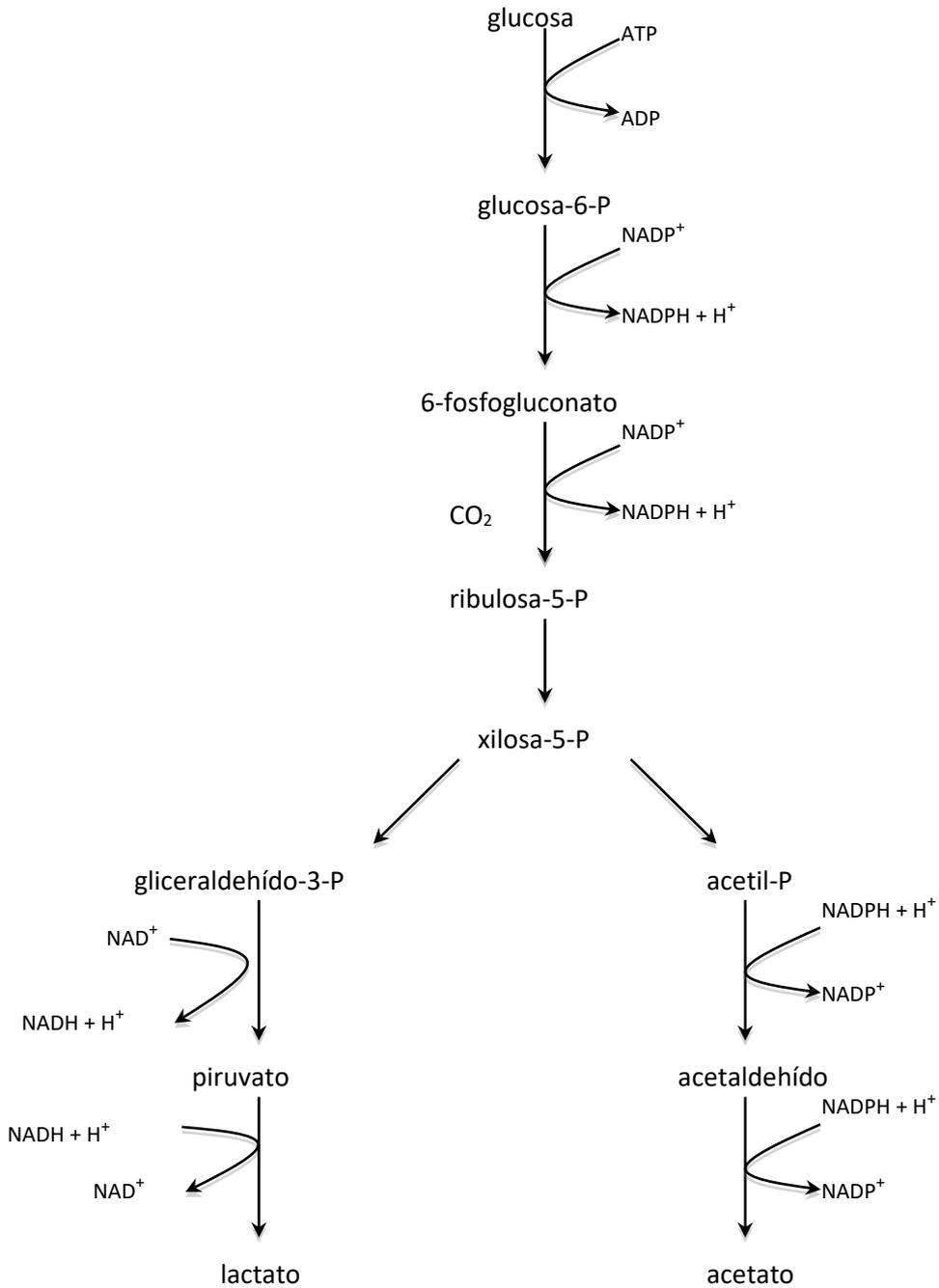


Figura 2. Fermentación de la glucosa por bacterias homofermentativas que también son heterofermentativas (productoras de ácido acético y láctico).

Adaptado de McDonald (1981)

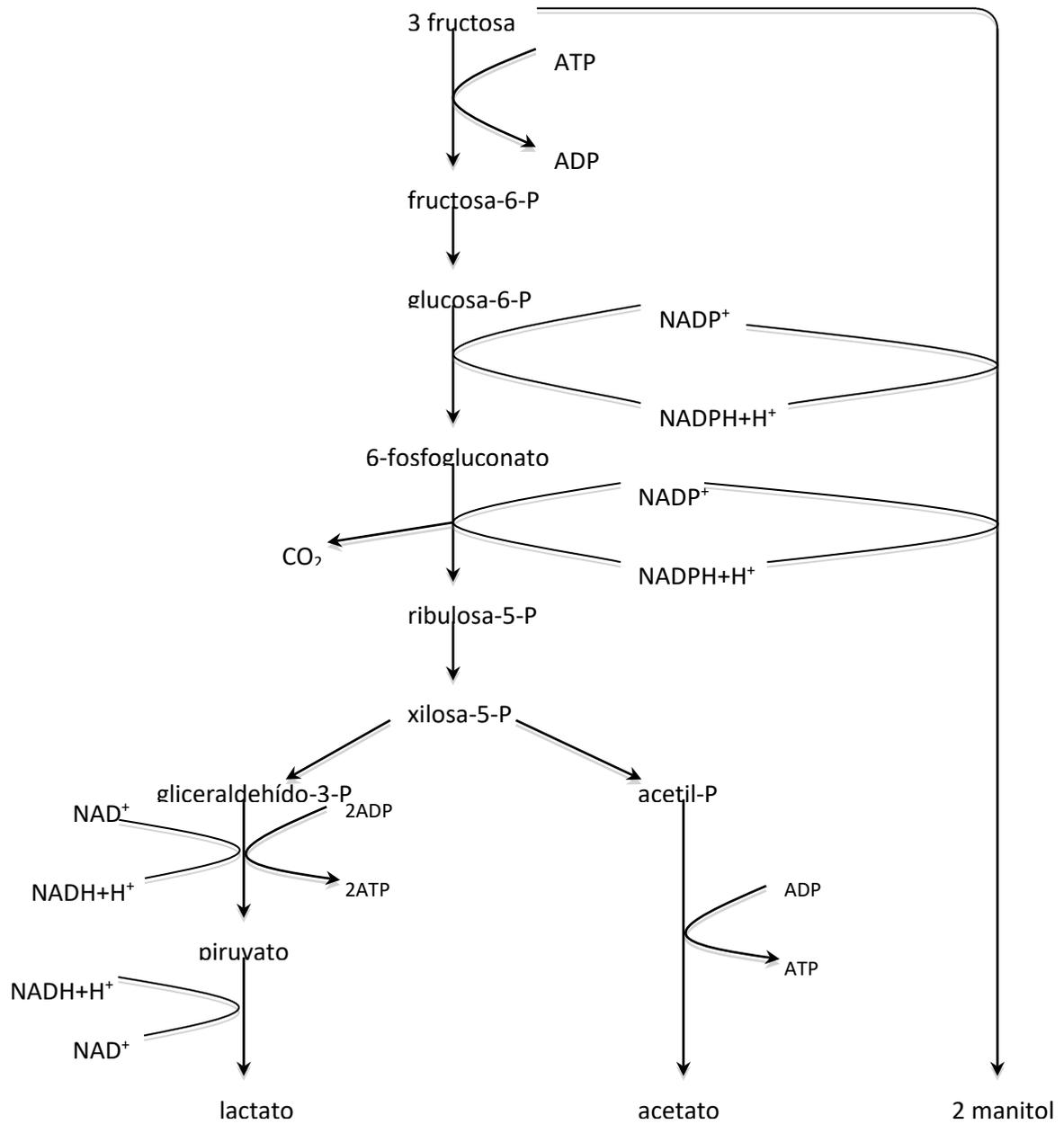


Figura 3. Reacciones de fermentación de la fructosa por bacterias homofermentativas que también son heterofermentativas (productoras de ácido acético y láctico). Adaptado de McDonald (1981)

Los coliformes, clostridios, hongos y levaduras son considerados microorganismos indeseables en el proceso fermentativo (Muck, 1988; Hiriart, 2008). Los coliformes son clasificados como anaeróbicos facultativos y no patogénicos; estos organismos requieren un pH neutral para su crecimiento óptimo por lo cual se asocian a las etapas iniciales de la fermentación, además compiten con las BPAL por los azúcares y pueden degradar proteínas (McDonald, 1981). Sin embargo, una vez que comienzan a proliferar las BPAL se incrementa la producción de ácido láctico y las poblaciones de coliformes se reducen (Pagán, 2006).

Como indicativo de la influencia de bacterias del género *Clostridium* en el proceso de ensilaje se utiliza la concentración de ácido butírico, debido a que este ácido es producto de la degradación del ácido láctico por estas bacterias (Figura 4), por consiguiente, el ácido butírico que es menos energético, reduce el valor energético y la calidad del ensilado. Cuando hay presencia de estas bacterias en el silo el nitrógeno amoniacal es muy alto, además los componentes nitrogenados se degradan en aminas como la cadaverina y el pH es superior a 5, por lo que el material no se preserva adecuadamente (McDonald, 1981; Hiriart, 2008).

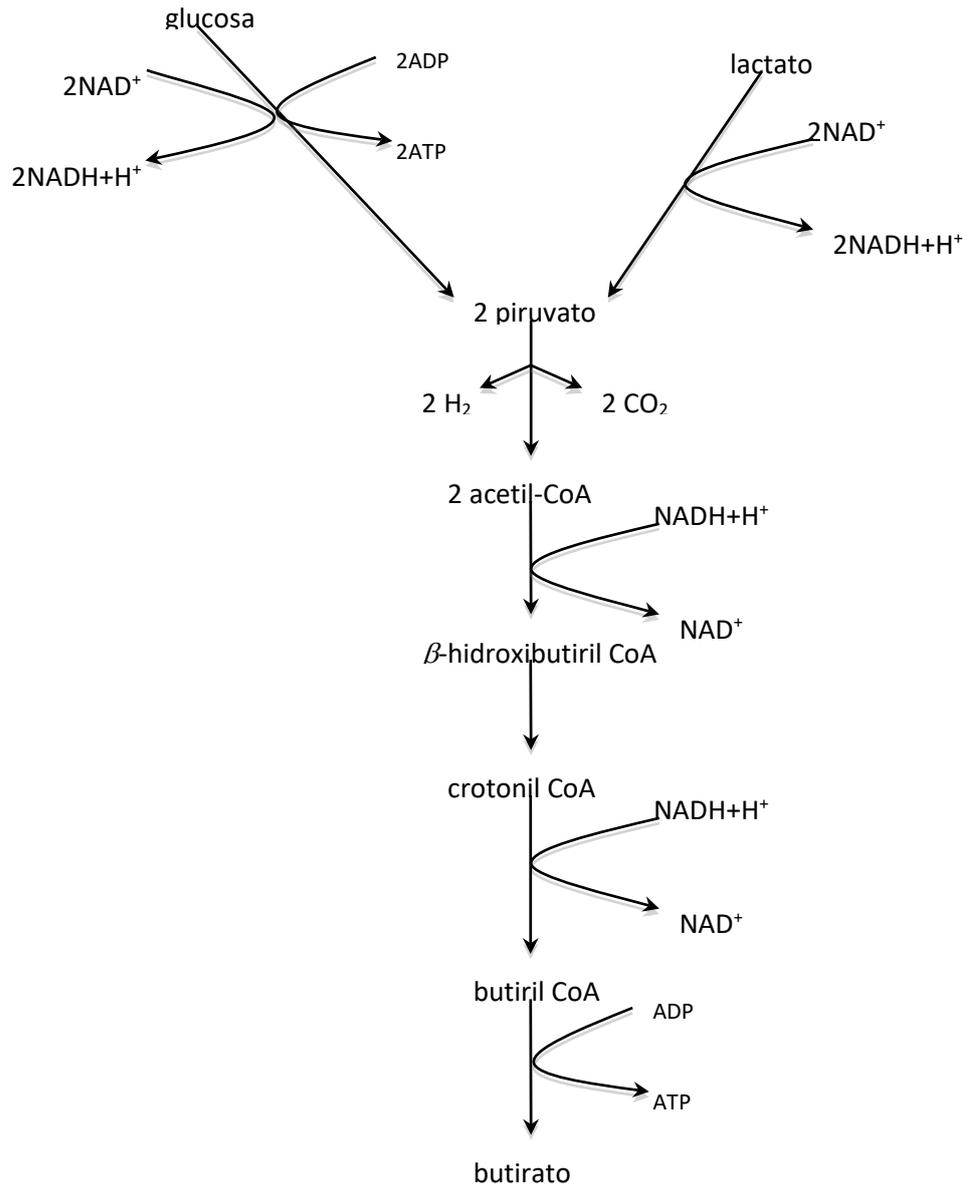


Figura 4. Fermentación de la glucosa y el lactato en *A. Butírico* por influencia de *Clostridia*.  
Adaptado de McDonald (1981)

#### 2.3.4. Etapas del proceso de ensilaje

Una vez que el material fresco ha sido picado, compactado y protegido con un plástico, el proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas (Moore y Peterson, 1995).

##### 2.3.4.1. Fase 1. Fase aeróbica.

Esta fase depende de la concentración inicial de oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal, la cual disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a la acción de los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos (levaduras y enterobacterias). Además, hay una importante actividad de proteasas y carbohidrasas (enzimas vegetales), siempre y cuando el pH se mantenga entre 6,0 – 6,5 en el jugo del forraje fresco. La duración de esta fase es importante debido a que puede comprometer la concentración inicial de carbohidratos solubles y afectar el proceso fermentativo.

##### 2.3.4.2. Fase 2. Fase de fermentación.

Esta fase se establece en los primeros 5 días y se inicia al producirse un ambiente anaeróbico, posterior a la compactación, el cual depende de las características del material ensilado y de las condiciones predominantes al momento de ensilarse el material. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad de las BPAL prolifera y se convierten en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH baja a valores entre 5,0 a 3,8.

##### 2.3.4.3. Fase 3. Fase estable.

Mientras se mantenga el material ensilado intacto, sin presencia de oxígeno, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; mientras que los clostridios y los bacilos sobreviven como esporas. Sólo algunos microorganismos especializados (*Lactobacillus buchneri*), como las enzimas proteasa y carbohidrasa toleran ambientes ácidos, continuando activos, pero a menor ritmo.

#### 2.3.4.4. Fase 4. Fase de deterioro aeróbico.

Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo, por roedores, pájaros y un mal manejo del emplastado.

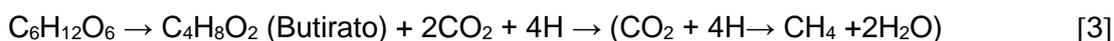
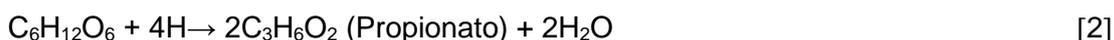
El período de deterioro puede dividirse en dos etapas: La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético (Moore y Peterson, 1995). Esto induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos como facultativos (mohos y enterobacterias) (Pagán, 2006).

El deterioro aeróbico ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire. Sin embargo, la tasa de deterioro depende de la concentración y de la actividad de los organismos que causan este deterioro en el ensilaje. Las pérdidas por deterioro oscilan entre 1,5 a 4,5 % MS por día, estas pérdidas son similares a las que pueden ocurrir en silos herméticamente cerrados y durante períodos de almacenaje de varios meses (Jones et al., 2004).

#### **2.4. Animales rumiantes y la metanogénesis en el rumen**

Los rumiantes tienen la capacidad para convertir los materiales ricos en celulosa como los pastos y forrajes, en alimentos para consumo humano, gracias a los microorganismos que habitan en sus preestómagos (Dijkstra et al., 2011). Los preestómagos de los rumiantes son: rumen, retículo y omaso, estas cavidades funcionan como cámaras de fermentación donde habitan diferentes especies de bacterias, hongos y protozoarios; que tienen la capacidad de degradar los componentes de la pared celular en moléculas más sencillas que son utilizadas como fuente de energía (Duncan, 2014). Como derivados de estos procesos de degradación se generan ácidos grasos volátiles (AGV) como productos finales de la actividad microbiana, principalmente: acetato, propionato y butirato, que el rumiante absorbe a través del rumen, para su propio uso (Buddle et al., 2011).

Durante el proceso de formación de los AGV, principalmente el acetato y butirato se liberan moléculas de gases como CO<sub>2</sub> e hidrógeno (H<sub>2</sub>), mientras que en la formación del propionato se consume principalmente H<sub>2</sub> (Jiao et al., 2013). La síntesis de AGV responde a las siguientes relaciones estequiométricas (Moss et al., 2000, Duncan, 2014).



Como se observa en las reacciones anteriores, la formación de acetato y butirato promueven la liberación de iones de hidrógeno (H) al medio ruminal, estos iones H, son utilizados junto con el CO<sub>2</sub>, por las bacterias metanogénicas quienes reducen el CO<sub>2</sub> a metano (CH<sub>4</sub>) (Buddle et al., 2011).

Los organismos metanogénicos representan un grupo muy específico de microorganismos del dominio *Archae*, genéticamente son similares a los eucariotas y eubacterias (Duncan, 2014), estos microorganismos poseen tres coenzimas que no han podido ser detectadas en otros grupos de microorganismos: las coenzimas 420 y M, así como el factor B; las dos últimas trabajan juntas en la formación de metano (Bouchard, 2011).

McAllister et al., (1996), lograron aislar de cultivos, 5 especies de organismos metanogénicos en el rumen, entre ellos: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosarcina bakeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium formicum* y *Methanomicrobium mobile*. De las 5 especies, sólo *Methanobrevibacter ruminantium* y *Methanosarcina bakeri*, se encontraron en poblaciones mayores a 1,0 x 10<sup>6</sup>/mL. Sin embargo, de acuerdo a Bouchard (2011), es difícil cultivar todas las poblaciones de organismos metanogénicos del rumen, aunque se han hecho avances utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Como se mencionó anteriormente, los organismos metanogénicos, utilizan el H<sub>2</sub> como fuente principal de energía y mediante procesos enzimáticos reducen el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, este proceso se conoce como metanogénesis (Bernier, 2011). Aunque la producción de metano se concibe como un proceso negativo, debido al pobre valor nutricional y la subsecuente pérdida de energía que genera su producción (Bouchard, 2011). La

metanogénesis es de importancia debido a que la acumulación de H<sub>2</sub> en el rumen podría inhibir el crecimiento o afectar la actividad de los otros microorganismos del rumen (Kasuya y Takahashi, 2010).

Siendo de esta manera, la metanogénesis se ve potenciada al utilizar el H<sub>2</sub> que se genera a partir de la síntesis ruminal del acetato y el butirato, muy abundantes en dietas forrajeras ricas en celulosa (Jiao et al., 2013). Mientras que, cuando se utilizan dietas altas en almidones, se estimula la formación de propionato, el cual compite por la utilización de H<sub>2</sub> con los organismos metanogénicos (Moss et al., 2000), lo que reduce la producción de metano en el rumen (Duncan, 2014).

Aproximadamente entre 89 y 90% del metano entérico se produce en el retículo-rumen, siendo liberado por la boca y la nariz mediante la eructación; el restante 10-11% se genera a lo largo del intestino delgado (Ominski et al., 2006), una parte es incorporada al torrente sanguíneo y liberado por los pulmones en la respiración, en tanto que el sobrante es excretado por el ano en las heces (Murray et al., 2001).

## **2.5. La metanogénesis y las fuentes de alimento**

Según Dijkstra et al., (2011) la cantidad de metano producido por los rumiantes depende de la cantidad de biomasa degradada por la actividad microbiana en el rumen. Además de acuerdo a Bernier (2011), la composición y el consumo del alimento son los principales factores que afectan la producción de metano en rumiantes. Siendo así y como se ha venido planteando anteriormente, la formación de acetato promueve la formación de H<sub>2</sub> (Jiao et al., 2013) y la síntesis de propionato consume H<sub>2</sub>, reduciendo la producción de metano, por tal motivo y de acuerdo a lo publicado por Christophersen et al., (2008), la metanogénesis en el rumen tiene una relación inversa con la relación acetato:propionato (A:P), la cual se ve influenciada por el contenido de fibra en la dieta (Campabadal, 1999).

De esta manera, el uso de dietas con altos contenidos de carbohidratos estructurales promueven mayor producción de CH<sub>4</sub> en el rumen, que aquellas con mayor contenido de carbohidratos no estructurales como almidones (Archimède et al., 2011). Cuando los rumiantes consumen dietas altas en carbohidratos estructurales como los pastos y forrajes, se genera ambientes ruminales con pH mayor a 6 (Duncan, 2014), condiciones que favorecen la actividad de los organismos metanogénicos (Hindrichsen et al., 2005).

También el alimentar con dietas bajas en proteína y altos contenidos de energía proveniente de fibras, o azúcares, en condiciones de pH superior a seis, predisponen a un aumento de la metanogénesis en el rumen (Dijkstra et al., 2011). En el caso de los azúcares cuando el pH es mayor a 6, se fermentan hacia la vía del butirato, favoreciendo la metanogénesis (Hindrichsen et al., 2005; Dijkstra et al., 2011).

El uso de fibras fermentables sobretodo como fuentes de energía en dietas para animales lecheros se ha generalizado a nivel mundial (Firkins, 1997, Mansfield y Stern, 1994). Estas materias primas poseen altas concentraciones de hemicelulosa, celulosa y pectinas (Van Soest, 1978), situación que favorece la metanogénesis en el rumen, ya que las pectinas pueden ser 2,8 veces más metanogénicas que la xilosa (componente de la hemicelulosa) y 6,75 veces más que los almidones (Czerkawski y Breckenridge, 1969, Hindrichsen et al., 2004).

## **2.6. La metanogénesis y el tipo de forraje**

La ganadería tropical basa la alimentación en el uso intensivo de los pastos y forrajes, ya que éstos pueden aportar a bajo costo una parte sustancial de los nutrimentos requeridos por nuestros hatos de ganado bovino (Sánchez, 2007). Sin embargo, los pastos tropicales utilizan la ruta metabólica C4, lo que implica una mayor deposición de fibra en los tejidos de la planta, que en consecuencia provoca mayor metanogénesis en el rumen (Archimède et al., 2011). Caso contrario, los pastos C3 provocan menor producción de metano en el rumen debido a su composición química, estructural y digestibilidad (Shibata y Terada, 2010; Archimède et al., 2011)

Las plantas leguminosas, ampliamente utilizadas en sistemas silvopastoriles para la suplementación e intensificación de sistemas tropicales (Shelton, 2000), tienen la capacidad de reducir la metanogénesis debido a que poseen menor contenido de fibra, mayor contenido de proteína y mayor digestibilidad (Church et al., 2003). También contienen metabolitos secundarios presentes en sus tejidos, tales como los taninos condensados y las saponinas (Archimède et al., 2011; Wang, 2012; Pinski, 2013). Sin embargo, Archimède et al., (2011) también indican que existen diferencias entre las leguminosas, señalando que las leguminosas de clima templado son más metanogénicas que las leguminosas tropicales.

Las leguminosas también pueden reducir la metanogénesis debido a que poseen mayor contenido de nitrógeno en su composición bromatológica, generalmente en niveles de 12 a 30% (Flores et al., 1998). Esto lo respalda la afirmación realizada en las

investigaciones de Hindrichsen et al., (2005) y Shibata y Terada (2010) quienes indican que es posible reducir la metanogénesis al aumentar el nivel de proteína en la dieta de los rumiantes.

De acuerdo a Bernier (2011) y Shibata y Terada (2010), aunque la calidad del forraje afecta la actividad de los microorganismos del rumen además de la producción de metano, hay factores como la especie del forraje, el procesamiento que recibe el forraje, la proporción de uso del forraje con respecto a otras fuentes de alimento como los granos que también pueden afectar la actividad de los organismos metanogénicos.

## **2.7. Estrategias para reducir emisiones de metano en el rumen**

### *2.7.1. Uso de Ionóforos*

Los ionóforos, son sustancias altamente lipofílicas, que son tóxicas para muchos tipos de bacterias (Wang, 2012), por este motivo se ha difundido su uso en la formulación de alimentos balanceados para rumiantes, estos interfieren con diferentes rutas metabólicas de los microorganismos del rumen (Guan et al., 2006). El ionóforo más investigado en alimentación de rumiantes es la monensina sódica, aunque es posible encontrar a nivel comercial otros productos como: ácido lasalocídico, salinomocina, nigericina y gramicidina (Lascano y Cárdenas, 2010).

Cuando se incluyen ionóforos en las formulaciones de los rumiantes, el efecto sobre la metanogénesis no es directo, por eliminación de los organismos metanogénicos, lo que concuerda con lo reportado por Hook et al., (2009), quienes determinaron que el uso de monensina no altera las poblaciones de metanogénicos en el rumen ni en cantidad ni en diversidad de especies. Sino que afectan la formación de metano ruminal de forma indirecta, de tres maneras diferentes que son:

1. Reducen la conversión alimenticia, al reducir la cantidad de metano producido por unidad de producto obtenido (kg de leche o carne) (Wang, 2012). De acuerdo a lo anterior, Lascano y Cárdenas (2010) indican que cuando se suplementan dietas altas en concentrados, los animales reducen entre 5 y 6% el consumo de materia seca (CMS), mientras que la conversión aumenta 6 y 7%; sin embargo, también señalan que en dietas basadas en pastoreo el resultado tiende a ser más variable.

2. Los ionóforos también pueden reducir la cantidad de metano producido por unidad de materia seca consumida, aunque se ha generado poca información acerca de este efecto en el consumo de forrajes (McGinn et al., 2004).

Odongo et al., (2007) indican que es posible reducir las emisiones de metano, cuando se utilizan ionóforos en dietas con una relación forraje:concentrado de 60/40. Además, indican que la reducción del metano emitido tiene un rango muy amplio de efecto (0 – 76%), la variación en los resultados se relacionan con el tipo de ionóforo y la dosis utilizada, Grainger et al., (2008) señalan que en estudios realizados *in vivo* es posible obtener una reducción del 18% en la metanogénesis.

3. Finalmente, según Guan et al., (2006), los ionóforos tienen la capacidad de reducir las poblaciones de protozoarios ciliados, que son huéspedes de los organismos metanogénicos en el rumen, situación que explica su capacidad para reducir la emisión del metano, ya que, al bajar la cantidad de ciliados huéspedes, se disminuye la población de organismos metanogénicos.

Una preocupación en el uso de los ionóforos, se fundamenta en el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos del rumen de manera que la reducción de metano por unidad de alimento consumido, se vería comprometida en el corto plazo (Wang, 2012).

Sauer et al., (1998) obtuvieron en un primer experimento todos los efectos esperados de la monensina como: aumento en la producción, reducción en la grasa láctea, disminución en la producción de metano. Pero al volver a utilizar monensina en una segunda oportunidad, en los mismos animales no se obtuvieron resultados en la mejora de la fermentación ruminal, lo que supondría una posible adaptación de los organismos del rumen, tal y como lo menciona Guan et al., (2006).

### 2.7.2. *Uso de probióticos*

Muchos probióticos han sido desarrollados de forma comercial, para utilizarse como aditivos que optimicen la producción de los animales rumiantes mediante la manipulación de las poblaciones de microorganismos y el proceso de fermentación en el rumen (Lascano y Cárdenas, 2010).

De acuerdo a Chaucheyras et al., (1995) la presencia de levaduras permite a los organismos del rumen competir por el hidrógeno contra los organismos metanogénicos, lo que permitiría la reducción de metano a nivel de rumen. Por su parte Newbold et al., (1998), indican que la presencia de levaduras incrementa en 49% las poblaciones de organismos celulolíticos, además apuntan que este incremento puede ser debido a la reducción en las poblaciones de protozoarios, que han sido vinculados a mayor producción de metano en el rumen (Buddle et al., 2011).

### 2.7.3. Defaunación

Se conoce como defaunación al proceso para eliminar los protozoarios del ambiente ruminal, sin embargo, este proceso puede ser arriesgado para el animal, ya que la mayor parte de los agentes para defaunación son tóxicos para el rumiante, además reduce la degradación de la fibra en el rumen (Duncan, 2014). De acuerdo a Li (2012), la defaunación puede reducir 60% de la metanogénesis en el rumen, por su parte Shibata y Terada (2010), reportan reducción de 20 – 40% en la producción ruminal de metano.

Los protozoarios constituyen una parte considerable de la población total de microorganismos del rumen (Bouchard, 2011). La población de protozoarios, es dinámica y está sujeta a cambios de acuerdo a su especificidad de huésped, distribución geográfica, composición de la dieta e infecciones de animales jóvenes (Zhou, 2012; Li, 2012), de esta manera, su población es más diversa en dietas altas en forrajes, mientras que es menos diversa o nula conforme se aumenta el uso de granos o se está en condición de acidosis ruminal (Li, 2012)

En el rumen cerca del 20% de los organismos metanogénicos están asociados a protozoarios (Li, 2012). Los principales productos del metabolismo de los protozoarios son el butirato y el acetato (Hansen et al., 2006). Como se mencionó anteriormente en el proceso de formación de estos compuestos se libera  $H_2$ , que es la principal fuente de alimento de los organismos metanogénicos. Siendo así, existe una relación muy estrecha entre los organismos celulolíticos como los protozoarios y los organismos metanogénicos (Guan et al., 2006; Duncan, 2014), que facilita la rápida remoción del  $H_2$  del ambiente ruminal (Bouchard, 2011). De esta manera, la defaunación resulta una estrategia para la reducción de la metanogénesis (Hook et al., 2010; Buddle et al., 2011; Duncan, 2014), ya que al reducir la población de protozoarios se reduce la cantidad de organismos metanogénicos en el rumen (Guan et al., 2006), esto concuerda con lo reportado por Dohme et al., (1999), quienes indican que la defaunación puede reducir las emisiones de metano debido a que se

reduce la cantidad de H<sub>2</sub> que es transferido de los protozoarios a los organismos metanogénicos.

#### *2.7.4. Uso de grasas y aceites esenciales*

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas, estos son responsables del olor y color de las plantas y especias, están compuestos por monoterpenos, aldehídos y compuestos aromáticos (Bouchard, 2011). Mientras que las grasas o lípidos son moléculas orgánicas compuestas por ácidos grasos y glicerol, estos ácidos grasos pueden ser de cadena larga o corta y saturados o insaturados, de acuerdo a su origen (Church et al., 2003). En el caso de las grasas se pueden utilizar ácidos grasos libres, aceites insaturados u otras fuentes de grasas como el sebo o semillas (Hook et al., 2010).

Las grasas son utilizadas en la formulación de alimentación de rumiantes, con el propósito de aumentar la densidad energética de la dieta, en mantenimiento o en producción (grasas) o como sustitutos de antibióticos (Aceites esenciales) (Duncan, 2014). Ambos, han demostrado capacidad para reducir la metanogénesis en el rumen (Johnson et al., 2002), aunque se ha determinado que el impacto en la metanogénesis depende del tipo de grasa o aceite utilizado (Duncan, 2014).

La reducción de la metanogénesis ocurre de dos maneras: 1) la forma indirecta donde sobreviene la inhibición de los protozoarios, reducción de los enlaces dobles en los ácidos grasos insaturados (competencia por H<sub>2</sub>) reducción en la producción de acetato y aumento en la producción de propionato (competencia por H<sub>2</sub>); y 2) la forma directa donde ocurre intoxicación de los organismos metanogénicos con los ácidos grasos, al adherirse a la membrana celular e interrumpir el proceso transporte (Iqbal et al., 2008).

Un meta-análisis de reducción de metano por suplementación de grasas, determinó que la producción de metano se reduce 2,2%, por cada 1% de grasa, incluido en la dieta. Beauchemin et al., (2008) reportan reducciones de 5,6% de la producción ruminal de metano por cada 1% de grasa en la dieta. También, Mao et al., (2010) señalan que el uso de aceite de soya (3% de la dieta en materia seca) redujo la producción de metano en el rumen.

De acuerdo a (Woodward et al., 2006), el uso de aceites de pescado y de girasol permiten la disminución del 27% de la producción de metano en el rumen, cuando se utilizan

dosis de 500g/animal/día. Asimismo, Grainger y Beauchemin (2011) detectaron reducción en la producción de metano al sustituir granos de cebada por Granos y Solubles de maíz (DDGS por sus siglas en inglés), asociando la reducción en la metanogénesis con el mayor contenido de aceites presentes en los DDGS.

Hook et al., (2010) indican que, cuando se utilizan mezclas de ácidos grasos se obtienen mejores resultados en la reducción de la producción de metano en el rumen debido a un efecto sinérgico entre los ácidos, por este motivo es más efectivo utilizar aceites que los ácidos grasos aislados, esta afirmación es respaldada por Martin et al., (2008) quienes además exponen que la presentación de la fuente de aceite influye en el resultado de inhibición de la metanogénesis. En lo que respecta a los aceites esenciales, estos pueden reducir la metanogénesis, al suprimir las poblaciones de bacterias gram-positivas (productores de acetato) (Bouchard, 2011; Li, 2012), lo que disminuye la cantidad de hidrógeno disponible para los organismos metanogénicos (Hook et al., 2010).

Chung et al., (2011) establecieron que existe interacción entre la fuente de grasas y el tipo de forraje, cuando se utilizó semillas de linaza, en dietas en base a ensilaje de cebada, se presentó disminución de la metanogénesis, sin embargo, no hubo reducción en dietas basadas en heno de pasto, esto concuerda con lo reportado por Zhou (2012) quien sugiere que otras variables como: la transformación del forraje, la tasa de pasaje por el rumen asociada al nivel de consumo, poseen un efecto mayor sobre la metanogénesis que el uso de grasas.

De acuerdo a Bouchard (2011) los aceites esenciales también pueden ejercer un efecto directo sobre los organismos metanogénicos debido a su poder antimicrobiano (Manasri et al., 2012; Wanapat et al., 2014), que trabaja de dos maneras: 1) al cambiar la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias y 2) mediante el contacto con sus compuestos activos, principalmente los fenólicos (Tager, 2010). Estos componentes pueden ser utilizados como extractos o por el uso directo de las partes de las plantas (Pinski, 2013).

Conforme a lo anterior, en la investigación de Busquet et al., (2005) citado por Crawford (2006), se determinó que es posible reducir en 73,6% la producción de metano, al utilizar aceite esencial de ajo a cuatro niveles de inclusión (3, 30, 300, and 3000 mg/L de fluido ruminal) en animales que consumen dietas con heno de alfalfa y concentrado en proporción 50:50. Por su parte, Tekippe et al., (2011), encontraron que al utilizar 500g/d de hojas de orégano (*Origanum vulgare*), se pueden reducir la producción de metano en 40%,

comparados con animales que no consumen hojas de orégano en la ración totalmente mezclada.

También Pinski (2013), obtuvo reducción en la producción de metano *in vitro* cuando utilizó aceites de canela (*Cinnamomum cassia*), clavo de olor (*Eugenia caryophyllus*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y anís (*Illicium verum*), en dosis de 500mg/L de fluido de cultivo. Este último autor indica que diferentes aceites esenciales producen diferentes efectos en la fermentación ruminal y por ende en la metanogénesis, tal y como se observa en los ejemplos citados anteriormente.

#### 2.7.5. Cambios en tipo de carbohidratos

Los carbohidratos son el componente principal de los tejidos vegetales, constituyen hasta el 70% o más de la materia seca de los forrajes; además, son la principal fuente de energía para los rumiantes (Church et al., 2003). Los carbohidratos de los tejidos vegetales se dividen en los que pertenecen a la fibra de la planta (celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina) y los que no pertenecen a la fibra (azúcares, almidones y ácidos orgánicos) (Mertens, 1996). Como se explicó anteriormente, la cantidad de metano producido por los rumiantes depende de la cantidad de biomasa degradada por la actividad microbiana en el rumen (Dijkstra et al., 2011). Por lo tanto, la composición de la dieta, como el consumo del alimento, son factores que afectan la metanogénesis ruminal (Bernier, 2011).

El uso de dietas con altos contenidos de carbohidratos estructurales; como las utilizadas en los sistemas de producción de rumiantes del trópico (Sánchez, 2007); promueven mayor producción de CH<sub>4</sub> en el rumen, debido a que incrementan la concentración de acetato y el butirato en el rumen (Jiao et al., 2013). Por el contrario dietas más abundantes en carbohidratos no estructurales como los almidones (Archimède et al., 2011) aumentan la síntesis de propionato que compite por el H<sub>2</sub> con las bacterias metanogénicas (Moss et al., 2000).

Por esta razón, el uso de dietas donde se utilizan alimentos balanceados concentrados (> 50% de la materia seca total/día) puede reducir de forma directa el metano producido en el rumen, debido a la disminución en las poblaciones de protozoarios, reducción del pH ruminal y alteración de la relación acetato:propionato (A:P) (Campabadal, 1999; Hindrichsen et al., 2005; Duncan, 2014). Sin embargo, la alimentación con granos es limitada e ignora la importancia de los rumiantes como convertidores de alimentos fibrosos no aptos para el consumo humano (Grainger y Beauchemin, 2011).

El utilizar concentrados representa una limitación económica para los sistemas de producción en el trópico (Lascano y Cárdenas, 2010), y su uso excesivo, sin precaución, puede provocar aparición de enfermedades metabólicas (Russell y Rychlik, 2001); que podrían afectar la salud y productividad de los animales. Para Mc Geough et al., (2010) el uso de almidones para reducir la formación de metano entérico no debe comprometer el adecuado desempeño y salud del animal. Por lo tanto en sistemas de pastoreo se deben utilizar forrajes con capacidad para reducir la producción de metano y no incrementar el uso de alimentos balanceados (Lascano y Cárdenas, 2010).

Benchaar et al., (2001) recomiendan que los concentrados deben poseer mayor contenido de almidones de lenta degradación en el rumen como el maíz, en lugar de los de rápida degradación como la cebada, estos almidones de lenta degradación escapan de la fermentación ruminal y son absorbidos en el intestino delgado, sin embargo para que esta estrategia sea efectiva los carbohidratos que llegan deben ser absorbidos o de lo contrario, se fermentarán aumentando la producción de metano a nivel intestinal (Hoover, 1978; Moss et al., 2000).

La fibra digestible es considerada como uno de los mayores factores que promueven la metanogénesis (Moss et al., 2000), sin embargo las dietas altas en azúcares han demostrado poseer mayor potencial para la producción de metano, debido a que con un pH mayor a 6 los azúcares (principalmente sacarosa) son degradados y van a la vía del ácido butírico (Hindrichsen et al., 2005), por este motivo el uso de azúcares se considera una estrategia para reducir la producción de metano cuando se utilizan dietas que predisponen un ambiente ruminal ácido (Dijkstra et al., 2011).

Es posible encontrar diferencias en las emisiones de metano entre fuentes forrajeras. Según Kasuya y Takahashi (2010) estas diferencias se deben a los contenidos de celulosa y hemicelulosa en los forrajes, por lo que sugieren el uso del consumo de fibra detergente neutro digestible (iFDNd), como un indicador de consumo de carbohidratos estructurales y de la metanogénesis. Además, conforme los forrajes maduran se reduce la digestibilidad y el contenido de nitrógeno, pero aumentan los niveles de fibra y lignina; el consumo de estos forrajes aumenta la relación acetato:propionato (A:P) en el rumen, situación que favorece la producción de metano por unidad de forraje consumido (Boadi et al., 2002).

### 2.7.6. Tipo de conservación y presentación del forraje

El efecto de las técnicas de conservación como el ensilaje, la henificación y el henolaje, sobre la metanogénesis ha sido poco documentado, sin embargo se ha reflexionado que los procesos para la conservación de los forrajes pueden influir en la producción de metano (Benchaar et al., 2001), esto es debido a la concentración final de fibra en los forrajes conservados.

De esta manera, los materiales ensilados son menos metanogénicos que los henos o las pajas, porque durante el proceso del ensilaje la hemicelulosa de la fibra ha sido degradada por los microorganismos a través de procesos de hidrólisis (McDonald, 1981). Boadi et al., (2004) reportan disminución del 33% en la producción de metano ruminal, cuando se utilizó ensilado de alfalfa comparado con heno de alfalfa, cortados a la misma edad.

Además, al reducir la concentración de hemicelulosa se reduce el contenido de FDN en el forraje, con esto se incrementa la capacidad de consumo del rumiante (Cruz y Sánchez, 2000), esto coincide con lo publicado por Belyea et al., (1996) quienes estiman el consumo de materia seca del animal a partir de la concentración de FDN, al utilizar la ecuación  $CMS (\% PV) = 120 / \%FDN$ , así conforme se reduce el contenido de fibra en la dieta mayor es el consumo del rumiante. Este incremento en el consumo favorece la reducción en la metanogénesis por un aumento en la tasa de pasaje, lo que reduce la cantidad de alimento degradado en el rumen (Beauchemin et al., 2008).

Además, el tamaño de partícula del forraje en la dieta influye de manera positiva con la producción de metano, de acuerdo a Shibata and Terada (2010) terneros que fueron alimentados con heno picado presentaron mayor producción de metano con respecto a los que fueron alimentados con heno entero o en fibras largas.

### 2.7.7. Selección de plantas con metabolitos secundarios

Los principales compuestos encontrados en las plantas con capacidad para reducir las emisiones de metano son: taninos, saponinas y aceites esenciales, tanto los taninos como los compuestos fenólicos son tóxicos para los microorganismos del rumen, específicamente contra protozoarios ciliados, bacterias fibrolíticas y metanogénicos (*Archae*) (Lascano y Cárdenas, 2010).

Hook et al., (2010) explican que los taninos actúan de dos maneras en el rumen, reducen la disponibilidad de H<sub>2</sub> e inhiben la actividad de los microorganismos metanogénicos. De acuerdo a Goel y Makkar (2012) la efectividad de los taninos, depende de la concentración y cantidad de grupos hidroxilo presentes, además apuntan que existen diferencias en el efecto obtenido de acuerdo al tipo de tanino, siendo la vía de los taninos condensados la de la reducción en la digestión de la fibra (De Oliveira et al., 2007) y la vía de los taninos hidrolizables a través de la inhibición del crecimiento y actividad de los microorganismos metanogénicos y los productores de hidrógeno (Bouchard, 2012).

De acuerdo a Puchala et al., (2005) y Waghorn et al., (2002), las leguminosas tropicales son capaces de reducir la metanogénesis, debido a la concentración de taninos en sus tejidos, esto concuerda con las afirmaciones de Archimède et al., (2011), acerca de la posibilidad de reducir la metanogénesis, donde reportan mayor capacidad de reducir la metanogénesis con leguminosas tropicales, que con leguminosas de clima templado, debido a un menor contenido de taninos en estas últimas.

Grainger et al., (2009), detectaron reducción en la producción diaria de metano, de 326 g/d a 266 g/d y después a 244 g/d, cuando se aumentó la cantidad de taninos condensados de *Acacia mearnsii*, suplementados por día, en dosis de 0, 163, and 326 g/d, aunque también se diagnosticaron signos de enfermedad en los animales. Por su parte, Williams et al., (2011), determinaron que la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) y trébol pata de pájaro (*Lotus corniculatus*), poseen mayor contenido de taninos que la alfalfa (*Medicago sativa*) y que son capaces de reducir la producción de metano en rumiantes. Sin embargo, el uso de taninos involucra la posible reducción en el contenido de grasa y proteína en la leche (Chaves et al., 2006).

En cuanto al uso de saponinas, se ha determinado que su efecto en la reducción de la metanogénesis está asociado con la reducción en las poblaciones de protozoarios, por lo que reduce la disponibilidad de H<sub>2</sub>, para los organismos metanogénicos (Li, 2012 y Wang, 2012), un efecto similar al provocado en la defaunación, tal y como se explicó en apartados anteriores.

## 2.8. Literatura consultada

- Archimède H., Eugène M., Marie Magdeleine C., Boval M., Martin C., Morgavi D.P., Lecomte P., Doreau M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167: 59– 64
- Autoridad Nacional del Ambiente (ANAM). 2011. Panamá: Segunda Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC). ANAM, GEF, PNUD. Panamá 157p.
- Bampidis, V.A., Robinson, P.H. 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 128(3): 175-217.
- Bautista-Trujillo, G.U., Cobos, M.A., Ventura-Canseco, L.M.C., Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., Oliva-Llaven, M.A., Dendooven L., Gutierrez-Miceli, F.A. 2009. Effect of sugarcane molasses and whey on silage quality of maize. *Asian Journal of Crop Science* 1(1): 34-39.
- Beauchemin K.A., Kreuzer M., O'mara F., McAllister T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Animal Production Science* 48(2): 21-27.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M., Martinez T.F., McAllister T. A. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 2007. 85:1990–1996
- Bello-Lara, J.E., Balois-Morales, R., Sumaya-Martínez, M.T., Juárez-López, P., Rodríguez-Hernández, A.I., Sánchez-Herrera, L.M., Jiménez-Ruíz, E.I. 2014. Extracción y caracterización reológica de almidón y pectina en frutos de plátano 'Pera' (Musa ABB). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1501 – 1507.
- Benchaar, C., Pomar, C. and Chiquette, J. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science*. 81: 563–574.
- Berndt S. A. 2002. Composición nutricional y calidad de ensilajes de la zona sur. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 126 pp.
- Bernier J.N. 2011. Impact of cold acclimatization on nutrient utilization and enteric methane emissions of beef cows overwintered on low-quality forage diets supplemented with dried distillers grain with soluble. Tesis doctoral. Universidad de Manitoba, Winnipeg, Canadá. 225p.
- Betancourt M., Gonzalez I., Martinez De Acurero M. 2005. Evaluación de la calidad de los ensilajes. *Revista Digital Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela*. N°8 mayo-agosto. Maracay, Aragua, Venezuela. 1-5 pp. Consultado en: [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/betancourt\\_m/betancourt\\_m.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/betancourt_m/betancourt_m.htm), el viernes 15 de mayo de 2015 a las 9:15 am.

- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J. and Massé, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 84: 319–335.
- Boadi, D.A., Wittenberg, K.A. et McCaughey, W.P. 2002. Évaluation de l'incidence des suppléments de grain sur la production de méthane par les bouvillons en paissance au moyen de la technique de traçage à l'hexafluorure de soufre (SF<sub>6</sub>). *Canadian Journal of Animal Science* 82: 151–157.
- Bouchard K. 2011. Methane emissions and rumen microbial changes in steers fed condensed tannin containing diets under western Canadian conditions. Tesis doctoral. Universidad de Manitoba, Winnipeg, Canadá. 124p.
- Buddle B.M., Denis M., Attwood G.T., Altermann E., Janssen P.H., Ronimus R.S., Pinares-Patiño C.S., Muetzel S., Wedlock D.N. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188 (2011) 11–17
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Carro M.D., Kamel C. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 88: 4393-4404.
- Campabadal C. 1999. Factores que afectan el contenido de sólidos de la leche. *Revista Nutrición Animal Tropical* 5(1): 67-92.
- Canale A., Valente M.E., Ciotti A. 1984. Determination of volatile carboxylic acids (C<sub>1</sub>–C<sub>5</sub>) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35(11): 1178-1182.
- Canesin, R. C., Berchielli, T. T., Messana, J. D., Baldi, F., Pires, A. V., Frighetto, R. T. S., Fiorentini G., Reis R. A. (2014). Effects of supplementation frequency on the ruminal fermentation and enteric methane production of beef cattle grazing in tropical pastures. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(11): 590-600.
- Castillo M., Rojas A., Wingching R. 2009. Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna (*vigna radiata*). *Agronomía Costarricense* 33(1):133-146.
- Chacón A.R., Jiménez G., Montenegro J., Sasa J., Blanco K. 2014. Inventario nacional de gases de efecto invernadero y absorción de carbono 2010. Ministerio de Ambiente y Energía, Instituto Meteorológico Nacional: MINAE, IMN, GEF, PNUD. San José, Costa Rica. 64p.
- Chaucheyras F., Fonty G., Bertin G., & Gouet P. 1995. In vitro H<sub>2</sub> utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9): 3466-3467.
- Chaves, A.V., Thompson, L.C., Iwaasa, A.D., Scott, S.L., Olson, M.E., Benchaar, C., Veira, D.M. and McAllister, T.A. 2006. Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and

- carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Canadian Journal of Animal Science*. 86: 409-418.
- Christophersen C.T., Wright A-D.G., Vercoe P.E. 2008. In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *Journal of Animal Science* 86: 384–389.
- Chung Y.H., He M.L., McGinn S.M., McAllister T.A., Beauchemin K.A. 2011. Linseed suppresses enteric methane emissions from cattle fed barley silage, but not from those fed grass hay. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 321-329.
- Church D.C., Pond W.G., Pond K.R. 2003. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. LIMUSA WILEY. México D.F. 636 p
- Clavero T. 2011. Agroforestería en la alimentación de rumiantes en América Tropical. *Revista de la Universidad del Zulia* 2(2): 11-35
- Contreras-Govea, F.E., Muck R.E., Armstrong K.L., Albrecht K.A. 2009. Nutritive value of corn silage in mixture with climbing beans. *Animal of feed Science and Technology* 150:1-8.
- Crawford C.A. 2006. Effects of essential oil supplementation of a corn silage based diet fed to lactating Holstein dairy cows. Tesis de Maestría. Universidad de Nueva Hampshire, Durham. Estados Unidos. 74 p.
- Cruz M., Sánchez J. 2000. La fibra en la alimentación del ganado lechero. *Revista Nutrición Animal Tropical* 6(1): 39-74.
- Cumbre de Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CNUCC). 2012. Promoting agro-environmental management in dairy farming. Caso 6 presentado en la Conferencia de las partes (COP) 18. MAG, MINAET, CATIE, IICA, GIZ, Gobierno de Alemania. Doha, Qatar. 4p.
- Czerkawski, J. W. and Breckenridge, G. 1969. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. *Brazilian Journal of Nutrition* 23: 925 – 937.
- Davies D.R., Merry R.J., Williams A.P., Bakewell E.L., Leemans D.K., Tweed J.K.S. 1998. Proteolysis During Ensilage of Forages Varying in Soluble Sugar Content. *Journal of Dairy Science* 81(2): 444-453.
- De Oliveira, S.G., T.T. Berchielli, M.D.S. Pedreira, O. Primavesi, R. Frighetto, and M.A. Lima. 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 135(3-4): 236–248.
- Devendra C. 1995 Composition and nutritive value of browse legumes. *In Tropical animal nutrition*. D'mello J and C Devendra (eds). CAB INTERNATIONAL, UK p. 49 - 66.

- Devendra C., Pezo D. 2001. Crop-animal systems in Asia and Latin America: Characteristics, opportunities for productivity enhancement and emerging challenges, including comparisons with West Africa. In: Proceedings of an international conference on 'Sustainable crop-livestock production for improved livelihoods and natural resource management in West Africa. 19-22.
- Dijkstra J., Oenema O., Bannink A. 2011. Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3: 414–422
- Dohme F., Machmüller A., Estermann B.L., Pfister P., Wasserfallen A., Kreuzer, M. 1999. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in Applied Microbiology* 29(3): 187-192.
- Duncan A.V.M. 2014. Reduction of Enteric Methane Production: A Nutritional Approach. Tesis doctoral. Universidad de Carolina del Norte A&T en Greensboro. Estados Unidos. 123p
- Elferink O., Driehuis F., Gottschal J. C., Spoelstra S.F. 2005. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Institute for Animal Science and Health. Holanda. 1-14 pp.
- Esperance M., Ojeda F., Cáceres O. 1981. Marco fermentativo, valor nutritivo y producción de leche con hierba pangola ensilada con ácido fórmico o miel. *Pastos y Forrajes. Revista de la EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba.* 4. 237 pp.
- Eugène M., Archimède H., Sauvant, D. 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science* 85(1): 81-97.
- Filomena A., Rojas A., Wingching R. 2007. Valor nutritivo del heno de maní forrajero deshidratado en un secador solar. *Agronomía Costarricense* 31(2):79-86.
- Firkins J.L. 1997. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, 80(7): 1426-1437.
- Flores O.I., Bolivar D.M., Botero J.A., Ibrahim, M.A. 1998. Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial forrajero para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, 10(1): 1-10.
- Garnsworthy P.C., Craigon J., Hernandez-Medrano J.H., Saunders N. 2012. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking *Journal of Dairy Science.* 95(6): 3181-3189.
- Giger-Reverdin S., Duvaux-Ponter C., Sauvant D., Martin O., Nunes do Prado I., Müller, R. 2002. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 96(1): 83-102.

- Goel G., Makkar H.P.S. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health Production* 44: 729–739
- Grainger C., Beauchemin K.A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production. *Animal Feed Science and Technology* 166–167 (2011) 308–320.
- Grainger, C., Auldist, M.J., Clarke, T., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Hannah, M.C., Eckard, R.J., Lowe, L.B. 2008. Use of monensin controlled-release capsules to reduce methane emissions and improve milk production of dairy cows offered pasture supplemented with grain. *Journal of Dairy Science*. 91(3): 1159-1165.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C. and Eckard, R.J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 89: 241-251.
- Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). 2007. Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 pp.
- Guan H., Wittenberg K.M., Ominski K.H., Krause D.O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science* 84(7): 1896-1906.
- Gutiérrez F., Rojas-Bourrillón A., Dormond H., Poore M., WingChing-Jones R. 2003. Características nutricionales y fermentativas de mezclas ensiladas de desechos de piña y avícolas. *Agronomía Costarricense*. 27(1): 79-89.
- Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo K., Lea D.W., Medina-Elizade M. 2006. Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(39): 14288-14293.
- Hindrichsen I.K., Wettstein H.R., Machmuller A., Jorg B., Kreuzer M. 2005. Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environmental Monitoring and Assessment* 107: 329–350
- Hindrichsen, I. K., Wettstein, H.-R., Machmüller, A., Soliva, C. R., Bach Knudsen, K. E., Madsen, J. and Kreuzer, M. 2004. Effect of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release in vitro. *Journal of Animal Science*. 84: 265–276.
- Hiriart M. 2008. *Ensilados. Procesamiento y Calidad*. Editorial Trillas. 2da edición. México. 110p.

- Holmann F., Lascano C. 2001. Sistemas de alimentación con leguminosas para intensificar fincas lecheras. Consorcio Tropileche. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Documento de Trabajo No. 184. Cali, Colombia. 109p.
- Hook S.E., Wright A.D.G., McBride B.W. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 2010. 11 p.
- Hoover W.H. 1978. Digestion and absorption in the hindgut of ruminants. *Journal of Animal Science* 46(6): 1789-1799.
- Hristov A.N., Oh J., Firkins J.L., Dijkstra J., Kebreab E., Waghorn G., Makkar H.P.S., Adesogan A.T., Yang W., Lee C., Gerber P.J., Henderson B., Tricarico J. M. 2013. SPECIAL TOPICS-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*. 91: 5045–5069
- Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT). 2009. México: Cuarta Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) INE, SEMARNAT. México 274p.
- Iqbal M.F., Cheng Y.F., Zhu W.Y., Zeshan B. 2008. Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(12): 2747-2755.
- Jiao H.P., Yan T., Mcdowell D.A., Carson A.F., Ferris C.P., Easson D.L., Wills D. 2013. Enteric methane emissions and efficiency of use of energy in Holstein heifers and steers at age of six months. *Journal of Animal Science*. 91: 356–362
- Jiménez C., Pineda L., Medina A. 2001. Uso de aditivos en el ensilaje de *cratylia argentea*. En: *Sistemas de Alimentación con Leguminosas para Intensificar Fincas Lecheras*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.
- Johnson, K.A., Kincaid, R L., Westberg, H.H., Gaskins, C.T., Lamb, B.K., & Cronrath, J.D. 2002. The effect of oilseeds in diets of lactating cows on milk production and methane emissions. *Journal of Dairy Science*. 85(6): 1509-1515.
- Jones C. M., Heinrichs A. J., Roth G. W., Ishler V. A. 2004. From harvest to feed: Understanding silage management. Pennsylvania State University. College of Agricultural Sciences. 2-11 pp.
- Kasuya H., Takahashi J., 2010. Methane Emissions from Dry Cows Fed Grass or Legume Silage. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 23(5): 563 – 566.
- Kinsman R., Sauer F.D., Jackson H.A., Wolynetz M.S. 1995. Methane and Carbon Dioxide Emissions from Dairy Cows in Full Lactation Monitored over a Six-Month Period. *Journal of Dairy Science*. 78: 2760 – 2766.

- Lascano C.E. 1995. Calidad nutritiva de *Cratylia argentea*. In: Pizarro, E. A y Coradin, L (eds).. Memorias Taller sobre *Cratylia*. EMBRAPA, CENARGEN, CPAC y CIAT Brasilia, Brasil. 83-97.
- Lascano C.E., Cárdenas E. 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*. (supl. especial). 39: 175-182.
- Lehmann, U., Jacobasch, G., Schmiedl, D. 2002. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18): 5236 – 5240.
- Li W. 2012. Using saponins to reduce gaseous emissions from steers. Tesis Doctoral. Universidad del Estado de Michigan, East Lansing. Estados Unidos. 164p
- Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57(4): 347-358.
- Lis-Balchin M. 2003. Feed additives as alternatives to antibiotic growth promoters: Botanicals. 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, AB, Canada. Vol 1. 333 p.
- Lobo M., Acuña V. 2001. Efecto de la edad de rebrote y la altura de corte sobre la productividad de *Cratylia argentea* cv. Veraniega en el trópico subhúmedo de Costa Rica. En: *Sistemas de Alimentación con Leguminosas para Intensificar Fincas Lecheras*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.
- López-Herrera M., Briceño-Arguedas E. 2016. Efecto de la frecuencia de corte y la precipitación en el rendimiento de *Cratylia argentea* orgánica. *Nutrición Animal Tropical* 10(1): 24 – 44.
- López-Herrera M., WingChing-Jones R., Rojas-Bourrillon A. 2009. Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas comosus*). *Agronomía Costarricense* 33(1): 1 – 15.
- Manasri N., Wanapat M., Navanukraw C. 2012. Improving rumen fermentation and feed digestibility in cattle by mangosteen peel and garlic pellet supplementation. *Livestock Science* 148: 291–295.
- Mansfield H.R., Stern M.D. 1994. Effects of soybean hulls and lignosulfonate-treated soybean meal, on ruminal fermentation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77(4): 1070-1083.
- Mao H.L., Wang J.K., Zhou Y.Y., Liu, J.X. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129(1): 56-62.
- Martin C., Rouel J., Jouany J.P., Doreau M., Chilliard Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*. 86(10): 2642-2650.

- Mc Geough E.J., O'Kiely P., Hart K.J., Moloney A.P., Boland T.M., Kenny D.A. 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *Journal of Animal Science*. 88: 2703–2716
- McAllister T.A., Okine E.K., Mathison G.W. Cheng K.J. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76: 231-243.
- McDonald P. 1981. *The Biochemistry of Silage*. John Wiley & Sons. Ltd. New York. 226 pp.
- McGinn S.M., Beauchemin K.A., Coates T., Colombatto, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*. 82(11): 3346 – 3356.
- Mertens D.R. 1996. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations. In: *Informational Conference with Dairy and Forages Industries*. US Dairy Forage Research Center. Madison, Wisconsin. United States. 81 – 92.
- Meyer M.J., Smith J.F., Harner III J.P., Titgemeyer E.C., Shirley J.E. 1998. Performance of lactating dairy cattle in three different cooling systems. Report of progress (Kansas Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service); Dairy Day 1998: 12-15
- Ministerio de Ambiente, Energía y Telecomunicaciones e Instituto Meteorológico Nacional (MINAET-IMN). 2014. Costa Rica: Tercera Comunicación Nacional a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. MINAET, IMN, GEF, PNUD. 2014. 112p.
- Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA). 2010. Uruguay: Tercera Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC). MVOTMA, FMAM, PNUD. Uruguay. 175p.
- Ministry for the Environment (MFE). 2011. New Zealand. Fifth National Communication to the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). MFE. New Zealand. 232p.
- Ministry of Lands, Natural Resources and Environmental Protection (MLNREP). 2014. Zambia: Second National Communication to the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). MLNREP, GEF, PNUD. Zambia. 72p.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N. 2008. Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants-A review. *World Journal of Zoology* 3(2): 40-46.
- Mitsumori M., Sun W. 2008. Control of Rumen Microbial Fermentation for Mitigating Methane Emissions from the Rumen. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. Vol. 21(1): 144 – 154.

- Mohapatra D., S. Mishra, y N. Sutar. 2010. Banana and its by-product utilization: an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research* 69(5): 323 – 329.
- Moore K. J., Peterson M. A. 1995. Post-Harvest physiology and preservation of forages. *Crop Science Society of America Inc. Special publication No 22. Wisconsin, USA.* 91-107 p.
- Moreno A.H. 1977. Evaluación de ensilajes de pasto Panamá (*Saccharum sinense*), para la alimentación de vacas de doble propósito. Tesis MSc. Universidad de Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica. 98p.
- Moss A.R., Jouany J.P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 49: 231–253
- Mota, R.V., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R., Ciacco, C. 2000. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. *Starch/Stärke* 52(2-3): 63 – 68.
- Muck R.E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *Journal of Dairy Science* 71(11): 2992-3002.
- Mühlbach, P. R. (2001). Uso de aditivos para mejorar el ensilaje de los forrajes tropicales. En: L. t Mannelje, editor, *Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Memorias de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. Estudio FAO Producción y Protección vegetal* (161): 157 – 171
- Murray P.J., Gill E., Balsdon S.L., Jarvis S.C. 2001. A comparison of methane emissions from sheep grazing pastures with differing management intensities. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 60: 93–97.
- Nascimento C.F.M.D. 2007. Emissão de metano por bovinos Nelore ingerindo *Brachiaria brizantha* em diferentes estádios de maturação. Tesis doctoral. Universidad de São Paulo. São Paulo, Brazil. 67 p.
- Newbold C.J., McIntosh F.M. and Wallace R.J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast. *Canadian Journal of Animal Science.* 78: 241–244.
- Nishida T., Eruden B., Hosoda K., Matsuyama H., Xu C., Shioya S. 2007. Digestibility, methane production and chewing activity of steers fed whole-crop round bale corn silage preserved at three maturities. *Animal Feed Science and Technology* 135(1-2): 42–51
- Ojeda F., Cáceres O., Esperance M. 1991. *Conservación de Forrajes.* Editorial Pueblo y Educación. 80pp.
- Ominski, K. H., Boadi , D. A. and Wittenberg, K. M. 2006. Enteric methane emissions from backgrounded cattle consuming all-forage diets. *Canadian Journal of Animal Science.* 86: 393–400.
- Pagán S. 2006. Caracterización del proceso fermentativo de ensilajes de residuos orgánicos de plantas procesadoras de piña (*Ananas comosus*) y china (*citrus sinensis*) y su

- evaluación en dietas para ovinos. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico. 79 pp.
- Pedreira M.D.S., Primavesi O., Lima M.A., Frighetto R., Oliveira S.G.D., Berchielli T.T. 2009. Ruminant methane emission by dairy cattle in Southeast Brazil. *Scientia Agricola* 66(6): 742-750
- Pelissari, F.M., Andrade-Mahecha, M.M., Sobral, P.J.D.A., Menegalli, F.C. 2012. Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Starch/Stärke* 64(5): 382 – 391.
- Pellikaan W.F., Hendriks W.H., Uwimana G., Bongers L.J.G.M., Becker P.M., Cone J.W. 2011. A novel method to determine simultaneously methane production during in vitro gas production using fully automated equipment. *Animal Feed Science and Technology* 168: 196– 205
- Peña P.M., Del Pozo P. 1992. Explotación de pastos y forrajes. ISCAH: La Habana, Cuba. 106 p.
- Pezo D, Ibrahim M. 1998. Sistemas silvopastoriles. Colección de Modelos de Enseñanza Agroforestal No. 2. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Pinski B.N. 2013. Evaluating the effects of essential oils and condensed tannin on fermentation and methane production under in vitro conditions Tesis de Maestría. Universidad del Sur de Illinois, Carbondale. Estados Unidos. 82p.
- Playne M. J., McDonald P. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 17: 264-268
- Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L., Sahl, T. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*. 83(1): 182-186.
- Ravi, I., Mustaffa, M.M. 2013. Starch and amylose variability in banana cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology* 18(1): 83 – 87.
- Russell J.B., Rychlik J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292(5519): 1119-1122.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. 2006. Resistant starch—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5(1): 1 – 17.
- Sánchez J.M. 2007. Utilización eficiente de las pasturas tropicales en la alimentación del ganado lechero. XI Seminario de pastos y forrajes en sistemas de producción animal. Barquisimeto, Venezuela. 1 – 24.
- Sauer F.D., Fellner V., Kinsman R., Kramer J.K., Jackson H.A., Lee A.J., Chen, S. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science* 76(3): 906-914.

- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS). 2007. Argentina: Segunda Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC). SAyDS. Argentina. 201p.
- Shelton M. 2000. Leguminosas forrajeras tropicales en los sistemas agroforestales. *Unasyva*, 51(200), 25-32. Consultado en <http://www.fao.org/3/a-x3989s/x3989s06.htm> el día 5 de mayo de 2015 a las 11:45 pm.
- Shibata M., Terada F. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal* 81(1): 2 – 10.
- Tager L.R. 2010. Effects of essential oils on rumen fermentation, eating behavior and milk production in lactating dairy cattle. Tesis Doctoral. Universidad de Virginia del Oeste, Morgantown. Estados Unidos. 109p.
- Tekippe J.A., Hristov A.N., Heyler K.S., Cassidy T.W., Zheljzakov V.D., Ferreira J.F.S., Karnati S.K., Varga G.A. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 5065-5079.
- Tekippe J.A., Hristov A.N., Heyler K.S., Zheljzakov V.D., Ferreira J.F.S., Cantrell C.L., Varga G.A. 2012. Effects of plants and essential oils on ruminal in vitro batch culture methane production and fermentation. *Canadian Journal of Animal Science* 92: 395-408.
- Tobía C., Rojas A., Villalobos E., Soto H., Uribe L. 2004. Sustitución parcial el alimento balanceado por ensilaje de soya y su efecto en la producción y calidad de la leche de vaca, en el trópico húmedo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(2):27-35.
- Vargas R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37pp.
- Vilela D. 1998. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. Simpósio sobre aditivos na produção de ruminantes e não-ruminantes. *Anais dos Simpósios, XXXV Reunião da SBZ*. F.S Wechsler. 73-108p
- Waghorn G.C., Tavendale M.H., Woodfield D.R. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 64: 167–171
- Wanapat M., Chanthakhoun V., Phesatcha K., Kang S. 2014. Influence of mangosteen peel powder as a source of plant secondary compounds on rumen microorganisms, volatile fatty acids, methane and microbial protein synthesis in swamp buffaloes. *Livestock Science* 162(2014):126–133.
- Wang Q. 2012. Nutritional strategies to mitigate greenhouse gas emissions from cattle production. Tesis doctoral. Universidad de California en Davis. Estados Unidos. 123p.
- Wattiaux M. 1999. Introducción al proceso de ensilaje. Instituto Babcock. Universidad de Wisconsin. Feeding N° 502.

- Williams C.M., Eun J.S., MacAdam J.W., Young A.J., Fellner V., Min B.R. 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167: 364– 372.
- WingChing-Jones R., Rojas-Bourrillón A. 2005. Composición nutricional y características fermentativas del ensilaje de maní forrajero. *Agronomía Costarricense* 30(1):87-100.
- Woodward, S. L., G. C. Waghorn, and N. A. Thomson. 2006. Supplementing dairy cows with oils to improve performances and reduce methane – Does it work? *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 66:176–181.
- Yitbarek, M.B., Tamir, B. 2014. Silage additives: review. *Open Journal of Applied Sciences* 4: 258-274.
- Zhou, M. (2012). Rumen methanogenic ecology under different diets and cattle feed efficiency. Tesis doctoral. Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá. 235p.

## **CAPITULO 3.**

### **EFFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS EN LA CALIDAD FÍSICA Y QUÍMICA DE MEZCLAS PARA ENSILAJE**

### **CAPITULO 3. EFFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS EN LA CALIDAD FÍSICA Y QUÍMICA DE MEZCLAS PARA ENSILAJE**

### 3.1. RESUMEN

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos sobre las características físicas y químicas del ensilaje de las mezclas elaboradas a partir de las leguminosas, *Arachis pintoi*, *Vigna unguiculata*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana*, con 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, grano de maíz molido y fruto inmaduro de guineo cuadrado). Los forrajes fueron cosechados en Upala, Costa Rica, aunque la parte experimental se desarrolló en Montes de Oca, Costa Rica. Las mezclas se almacenaron durante 50 días en silos de bolsa con capacidad para 5 kg. El experimento se desarrolló entre 2015 y 2016, este consta de un arreglo factorial 4x4 de 16 tratamientos. Los ensilados analizados presentaron características de olor, color y textura de calidad media a buena. Los valores de pH fluctuaron entre 4,5 y 5,8, y los valores de nitrógeno amoniacal variaron entre 4,3 y 14,6%. Los tratamientos con inclusión de fuentes de almidón y leguminosas arbustivas presentaron los niveles más altos ( $p < 0,05$ ) de pH y nitrógeno amoniacal; por lo tanto, fueron las mezclas ensiladas de menor calidad. La concentración de los ácidos grasos volátiles varió entre 0,8 y 6,5% MS para el ácido láctico, 2,5 y 6,9% MS para el ácido acético y, 0,1 y 1,8% MS para el ácido butírico. También se determinó alta correlación ( $\rho > 0,62$ ) entre la concentración de los ácidos acético y butírico con el contenido de humedad de las mezclas sin ensilar, mientras que el ácido láctico presentó correlación alta y negativa ( $\rho = -0,74$ ) con la humedad del forraje, todas las correlaciones fueron significativas  $p < 0,001$ . Los tratamientos elaborados a partir de leguminosas arbustivas con azúcares o con pectinas presentaron características físicas y químicas que los califican como ensilados de calidad media a buena, mientras que los elaborados a partir de leguminosas de piso y almidones presentaron características físicas y químicas que los califican como ensilados de regular a mala calidad, esto debido a la poca participación de los almidones en el ensilaje.

**Palabras clave:** Conservación de Forrajes, Ensilaje de leguminosas, Aditivos, Nitrógeno amoniacal.

### 3.2. ABSTRACT

**Effect of legume species and the source of carbohydrates on physical and chemical quality of mixtures for silage.** The objective of this experiment was to determine the effect of the legume species and the carbohydrate source on the physical and chemical characteristics of silage from mixtures made from the legumes, *Arachis pintoii*, *Vigna unguiculata*, *Cratylia argentea* and *Erythrina poeppigiana*, with 4 sources of carbohydrates (sugar cane molasses, dehydrated citrus pulp, ground corn kernel and immature saba banana fruit). Forages were harvested in Upala, Costa Rica, although the experimental component was developed in Montes de Oca, Costa Rica. The blends were stored for 50 days in bag silos of 5 kg. The experiment was developed between 2015 and 2016, this consists of a 4x4 factorial arrangement with 16 treatments. The silages analyzed had characteristics of smell, color and texture from medium to good quality. The pH values fluctuated between 4.5 - 5.8 and the ammonia nitrogen values varied between 4.3 - 14.6% NH<sub>3</sub>/TN. Treatments including starch sources and shrub legumes presented the highest levels of pH and ammonia nitrogen ( $p < 0.05$ ); therefore, they were the lesser quality ensiled mixtures. The concentration of the volatile fatty acids in the treatments ranged from 0.83 to 6.46% MS for lactic acid, 2.48 - 6.87% MS for acetic acid and 0.13 - 1.79% MS for butyric acid. A high correlations ( $\rho > 0.62$ ) was found between acetic and butyric acids concentrations with moisture content of non ensiled mixtures. On the other hand, lactic acid showed a high but negative correlation ( $\rho = -0.74$ ) with humidity content, all correlations were significant  $p < 0.001$ . Treatments made from shrub legumes and sugars or pectins presented physical and chemical characteristics that qualify them as medium to good silage. While the treatments elaborated from floor legumes and starches presented physical and chemical characteristics that qualify them as silage from regulate to poor quality, this due to the little participation of the starches in the silage.

**Keywords:** Forage conservation, Legumes silage, Additives, Ammonia nitrogen

### 3.3. INTRODUCCIÓN

El ensilaje es una técnica de conservación de forraje por vía húmeda, que consiste en almacenar forrajes en estado verde en ausencia de oxígeno, donde ocurren transformaciones químicas y físicas que definen su calidad (Hiriart, 2008). El ensilaje permite mantener la disponibilidad del componente forrajero durante la estación seca o lluviosa, además permite conservar materiales vegetativos como residuos de cosechas, subproductos agroindustriales, frutos, raíces, tubérculos y otros forrajes de uso no tradicional (López-Herrera et al., 2009).

Este proceso se logra por medio de una fermentación láctica espontánea inducida por la microflora epífita en los forrajes, en particular las bacterias productoras de ácido láctico (BPAL) (Davies et al., 1998) bajo condiciones anaeróbicas (Elferink et al., 2005). Este proceso de fermentación se ve favorecido por el valor inicial de pH, capacidad buffer del forraje, temperatura, y los contenidos de bacterias, carbohidratos solubles, materia seca y, el volumen de aire por volumen de material (Moore y Peterson, 1995)

Para la determinación de la calidad del resultado del ensilaje se pueden utilizar análisis químicos y/o físicos, que involucran el uso de tecnología o la percepción sensorial. Algunos de los análisis son: pH, Nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3/\text{NT}$ ), ácidos grasos volátiles y pruebas sensoriales (Hiriart, 2008), tal como: color, olor y textura (Betancourt et al., 2005).

En los ensilajes de leguminosas se debe considerar que estas plantas poseen mayor capacidad amortiguadora que las gramíneas, por su alto contenido de proteína (Moore y Peterson, 1995), lo que obliga a reforzar el contenido de carbohidratos disponibles para las BPAL; esto permite optimizar el proceso de ensilaje, por una rápida reducción del pH (Giger-Reverdin et al., 2002). Esto coincide con lo publicado por Playne y McDonald, (1966) quienes indican que la capacidad amortiguadora de los forrajes es influenciada por el contenido de proteína de la planta, la fibra y los aniones.

Otras investigaciones han determinado que es posible obtener ensilados de calidad a partir de leguminosas, siempre y cuando haya adecuada concentración de carbohidratos en la mezcla forrajera (McDonald, 1981). Castillo et al., (2009) determinaron valores de pH entre 3,1 y 3,6 y, concentraciones de nitrógeno amoniacal entre 2,5 y 3,9% en ensilados elaborados con *Vigna radiata* y maíz. Por su parte, Tobía et al., (2008) quienes analizaron ensilados de soya, obtuvieron valores entre 4,0 y 5,9 para el pH, 6,0 y 21,1% nitrógeno

amoniaco y 4,4 y 6,6% MS de ácido láctico, donde los mejores valores de cada variable coinciden con el mayor aporte de melaza de caña de azúcar.

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos en las características físicas y químicas de los ensilados obtenidos a partir de mezclas forrajeras de cuatro especies de leguminosas y cuatro fuentes de carbohidratos.

### **3.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### *3.4.1. Ubicación del experimento*

La parte experimental se llevó a cabo en el Campus Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca donde se localizan los laboratorios de Centro de Investigaciones en Nutrición Animal (CINA) lugar donde también se realizaron los análisis de las características organolépticas y de los parámetros químicos.

#### *3.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas*

Los forrajes para el experimento fueron obtenidos de la finca Agroecológica Vocaré ubicada en el cantón de Upala a 180 msnm, con precipitación y temperatura promedio anual de 2500 mm 25 °C respectivamente.

Las leguminosas se cosecharon de acuerdo al tipo de forraje (herbáceo o arbustivo), Las edades de corte que se utilizaron fueron: *Vigna radiata* (40 días), *Arachis pintoi* (40 días), *Cratylia argentea* (75 días) y *Erythrina poeppigiana* (75 días). de manera que no fueran muy maduros con alto contenido de fibra y lignina. Las especies arbustivas fueron cosechadas a 1,20m de altura, mientras que las leguminosas herbáceas fueron cosechadas al nivel de suelo.

Los niveles de inclusión de las fuentes de carbohidratos fueron: melaza 6,3% p/p, pulpa de cítricos deshidratada (PCD) 8,4% p/p, maíz molido 6,4% p/p y fruto inmaduro de guineo cuadrado 6,7% p/p, de manera que proveyeran 5% del total de carbohidratos no fibrosos de la mezcla. El 5% restante para alcanzar el 10 – 15% de carbohidratos no fibrosos, fue aportado por las leguminosas. El fruto inmaduro de guineo cuadrado se encontraba en estado inmaduro y completamente engrosado al momento de la cosecha.

### 3.4.3. *Diseño experimental y tratamientos*

El experimento constó de un diseño factorial completamente aleatorizado (4x4), con 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido y, fruto de guineo cuadrado) y 4 especies leguminosas (*Vigna radiata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argétea* y *Erythrina poeppigiana*), para un total de 16 tratamientos. Todos los tratamientos se uniformizaron con 10 % de carbohidratos no fibrosos, para asegurar adecuada fermentación de acuerdo a lo planteado por Vargas, (1979) e Hiriart, (2008). Además, se les agregó inóculo bacteriano artesanal (elaborado por fermentación anaeróbica durante 30 días, a partir de suero de leche, leche y melaza – *Lactobacillus* 1,0 x 10<sup>9</sup> UFC/mL) (1L/tonelada) con base en el peso en fresco; para todos los tratamientos. Cada tratamiento fue repetido 4 veces para un total de 64 microsilos, además cada bolsa se consideró como una unidad experimental.

### 3.4.4. *Procedimiento experimental*

El proceso de ensilaje se realizó mediante la técnica de microsilos, para este fin se utilizó bolsas de polietileno para empaque al vacío con capacidad para 5 kg y con un grosor de 0,0063 mm, cada bolsa se llenó con 4 kg de mezcla para ensilar. De cada bolsa se extrajo una muestra en fresco que fue colocada en una bolsa plástica y transportada en hielera para ser analizada en el CINA.

El material una vez depositado y compactado a mano, se extrajo el aire a fondo mediante una aspiradora. Posterior a la eliminación del oxígeno, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se colocaron en condiciones de laboratorio (25°C, 75% humedad relativa, aproximadamente) por 50 días, donde estuvieran protegidas del ataque de aves, roedores o labores rutinarias que podrían perjudicar el proceso de ensilaje.

### 3.4.5. *Variables a evaluar*

La muestra sin ensilar fue ingresada al CINA para determinar el contenido de materia seca mediante la metodología descrita en el manual de la AOAC (1998). A los 50 días de fermentación se realizó la apertura de los silos, de cada bolsa se tomó 1 kg de mezcla ensilada para determinar las características organolépticas del material, utilizando los indicadores planteados por Betancourt et al., (2005), para color, olor y textura, además se utilizó una escala de graduación donde el color se calificó de la siguiente manera: 0=negro, 1=pardo, 2=verde pardo, 3=verde oscuro y 4= verde olivo. El olor se calificó de acuerdo a la

escala: 0=butírico, 1=acético fuerte, 2=acético leve, 3=láctico. Finalmente, la textura se calificó con la escala: 0=mucílago, 1=suave, 2=medio, 3=firme y consistente.

El material restante se utilizó para determinar la concentración de nitrógeno amoniacal mediante la metodología empleada por Tobía, (2004) y el pH fue medido utilizando un potenciómetro de hidrógeno. Para la determinación de los ácidos grasos volátiles, se utilizó la técnica descrita por Canale et al., (1984) de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con un equipo Agilent Technologies modelo 1260 Infinity con una columna Agilent Hi-Plex H.

#### *3.4.5. Análisis de la información*

El análisis de la información se realizó con un Modelo ANOVA de INFOSTAT y por medio de contrastes ortogonales (Di Rienzo et al., 2015) considerando como efectos principales: la fuente de carbohidratos (C), la especie de leguminosa (L) y la interacción de todas las fuentes principales (L\*C). Para el análisis de la evaluación organoléptica se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para análisis de la varianza no paramétrica con un nivel de confianza de 95%. También se realizó un análisis de correlación de Pearson entre todas las variables de evaluación organolépticas, de fermentación y el contenido de humedad del ensilado. Finalmente, para la comparación entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

### 3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.5.1. Características organolépticas de los materiales ensilados

##### 3.5.1.1. Color

El color de los materiales ensilados fue afectado ( $p < 0,0001$ ) por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos agregado (Cuadro 1). Todos los tratamientos presentaron coloraciones mayores al grado 3 en la escala de graduación utilizada, es decir colores verdes. Sólo los tratamientos donde se combinó *Arachis*, con fruto de guineo, pulpa de cítricos deshidratada o maíz; la escala de color presentó una calificación menor a 3, es decir colores pardos o negros.

Cuadro 1. Indicadores organolépticos del ensilado de mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	Color***	Olor	Textura
Vigna	Melaza	3,3 <sup>b</sup>	1,8 <sup>abc</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	PCD**	3,0 <sup>b</sup>	1,3 <sup>abc</sup>	1,0 <sup>a</sup>
	Maíz	3,0 <sup>b</sup>	1,0 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>b</sup>
	Guineo	3,5 <sup>b</sup>	0,5 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
Arachis	Melaza	3,0 <sup>b</sup>	1,3 <sup>abc</sup>	2,0 <sup>b</sup>
	PCD	1,0 <sup>a</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	2,0 <sup>b</sup>
	Maíz	2,8 <sup>b</sup>	1,5 <sup>abc</sup>	2,0 <sup>b</sup>
	Guineo	0,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>ab</sup>	1,0 <sup>a</sup>
Cratylia	Melaza	4,0 <sup>b</sup>	3,0 <sup>c</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	PCD	4,0 <sup>b</sup>	3,0 <sup>c</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	Maíz	3,0 <sup>b</sup>	2,5 <sup>bc</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	Guineo	3,3 <sup>b</sup>	2,7 <sup>bc</sup>	3,0 <sup>c</sup>
Erythrina	Melaza	4,0 <sup>b</sup>	1,0 <sup>ab</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	PCD	4,0 <sup>b</sup>	3,0 <sup>c</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	Maíz	4,0 <sup>b</sup>	2,8 <sup>bc</sup>	3,0 <sup>c</sup>
	Guineo	4,0 <sup>b</sup>	2,5 <sup>bc</sup>	3,0 <sup>c</sup>
L*C (Kruskal Wallis)		<0,0001	<0,0001	<0,0001

\* Fuente de carbohidratos

\*\* Pulpa de cítricos deshidratada

\*\*\*Color: 0=negro, 1=pardo, 2=verde pardo, 3=verde oscuro y 4= verde olivo.

Olor: 0=butírico, 1=acético fuerte, 2=acético leve, 3=láctico

Textura: 0=mucílago, 1=suave, 2=medio, 3=firme y consistente

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

De acuerdo a Betancourt et al., (2005) e Hiriart, (2008), la coloración de un ensilado puede indicar el tipo de proceso que se desarrolló en el silo, aunque siempre se espera un cambio de color en los materiales conservados. Se espera que ensilados donde ocurren adecuados procesos de ensilaje, posean coloraciones desde verde amarillento hasta verde

pardo, debido a que los ácidos orgánicos actúan sobre la clorofila, la cual pierde su magnesio, por lo que tiende a colores pardos o dorados.

Al contrario, materiales con coloraciones oscuras o negro se relacionan a procesos de ensilaje donde ocurre fuerte oxidación de los forrajes, debido a poca compactación del material y a la elevación de la temperatura en el silo, por lo que ocurre carbonización de los compuestos orgánicos del forraje. De esta manera, estos colores oscuros se relacionan a ensilados de mala calidad, ya que los carbohidratos más disponibles han sido oxidados en el proceso de fermentación.

Los colores obtenidos en esta investigación son similares a los conseguidos por Van Man y Wiktorsson (2002) con ensilados de *Gliricidia sepium*, con diferentes niveles de inclusión de melaza, además fueron similares a los determinados por Elizondo-Salazar y Campos-Granados (2014), con ensilados de cáscaras de piña con heno y urea, también fueron similares a los resultados obtenidos por López-Herrera et al., (2009) quienes trabajaron con ensilados utilizando pulpa de cítricos deshidratada como material absorbente de humedad.

#### 3.5.1.2. Olor

Esta variable fue afectada ( $p < 0,01$ ) por la especie de leguminosa forrajera en el silo (Cuadro 1). La fuente de carbohidratos no tuvo efecto sobre el olor del silo, de acuerdo a la escala utilizada, sin embargo, los tratamientos con inclusión de pulpa de cítricos deshidratada presentaron un leve olor a naranja, esto coincide con lo encontrado en el trabajo de López-Herrera et al., (2009) quienes trabajaron con ensilados utilizando pulpa de cítricos deshidratada como material absorbente de humedad.

El olor es una característica organoléptica que permite conocer el desarrollo del ensilaje, ya que depende de la concentración y tipo de ácidos orgánicos que se hayan producido durante el ensilaje (Adesogan, 2006). Se espera que durante la fermentación se produzcan todo tipo de ácidos orgánicos, aunque es deseable que sea mayor la concentración de ácido láctico o al menos que el ácido butírico esté ausente (Betancourt et al. 2005). Los olores dulces son propios de los procesos donde hubo formación de ácido láctico, sin embargo, también pueden ser obtenidos cuando ocurre fermentación alcohólica producto del metabolismo de levaduras (Driehuis y van Wixselaar, 2000), esto se debe a que el alcohol se une a los ácidos orgánicos y forma ésteres de olor agradable (Hiriart, 2008).

Por otra parte, olores desagradables y a putrefacción son propios de materiales de mala calidad, donde se ha generado ácido butírico (Betancourt et al., 2005). Los silos donde se obtienen valores de pH mayor a 4,4 generalmente muestran mayores concentraciones de ácido butírico, debido a mayor actividad de bacterias clostridiales, las cuales reducen la calidad del forraje conservado ya que aumentan las pérdidas de materia seca y de proteína en el ensilado (Adesogan, 2006). Además, aumenta la concentración de nitrógeno amoniacal (Mc Donald, 1981).

Los tratamientos donde se utilizaron especies arbustivas o arbóreas presentaron olores más dulces o con poco olor acético, mientras que los tratamientos donde se utilizaron leguminosas herbáceas tendieron a presentar olor acético, donde los tratamientos elaborados a partir de *Vigna* fueron los de mayor olor acético. De acuerdo a Kung y Shaver (2001) olores muy fuertes a ácido acético se relacionan a concentraciones entre 5 y 6% MS de ácido acético en el ensilado, lo que puede provocar rechazo del material, lo que reduce el consumo voluntario del animal. Solamente el tratamiento *Vigna*-Guineo presentó olor butírico o a material descompuesto.

#### 3.5.1.3. Textura

Esta variable fue afectada ( $p < 0,05$ ) por los efectos individuales de la especie de leguminosa forrajera y la fuente de carbohidratos utilizada en la mezcla ensilada (Cuadro 1). Se detectó alta correlación ( $\rho = 0,70$ ) entre el olor y la textura de los materiales, no así con el color de los ensilados, de esta manera un ensilado que presenta buen olor, presentará muy buena textura, mientras que materiales con mal olor, asociado a producción de ácido butírico se correlaciona con ensilados con texturas pegajosas y mucilaginosas. Al igual que con el olor, los tratamientos donde se utilizaron especies arbustivas o arbóreas presentaron mejor textura que los tratamientos donde se utilizaron leguminosas herbáceas, ya que estas últimas presentan en promedio textura suave a media.

Los tratamientos donde se utilizó melaza como fuente de carbohidratos, fueron los que presentaron mejor textura, mientras que en los que se utilizó fruto de guineo cuadrado se obtuvo la textura menos aceptable. A pesar de esto, todos los tratamientos presentaron texturas entre media a buena, lo que los clasifica como ensilajes de excelente a buena calidad (Betancourt et al., 2005).

### 3.5.2. Características químicas del ensilaje

#### 3.5.2.1. Potencial de hidrógeno (pH):

El grado de acidificación del ensilaje fue afectado por el tipo de carbohidrato agregado a la mezcla ensilada (Cuadro 2). De esta manera las mezclas que contienen carbohidratos más disponibles como la melaza, presentaron niveles de pH menores ( $p < 0,05$ ) con respecto a los tratamientos donde se utilizó fuentes de carbohidratos en forma de almidones, además, los tratamientos con inclusión de fruto de guineo cuadrado, presentaron niveles de pH mayores ( $p < 0,05$ ), esto puede ser debido a la disponibilidad de los carbohidratos presentes en el almidón al momento del inicio del proceso de ensilaje.

Cuadro 2. Valores de pH y nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3/\text{NT}$ ) de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación y materia seca (MS) antes del ensilaje. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	pH	$\text{NH}_3/\text{NT}$ (%)	MS (%)
Vigna	Melaza	4,5 <sup>a</sup>	4,3 <sup>a</sup>	13,5 <sup>a</sup>
	PCD**	5,4 <sup>c</sup>	11,7 <sup>c</sup>	17,3 <sup>b</sup>
	Maíz	4,9 <sup>b</sup>	6,4 <sup>b</sup>	13,1 <sup>a</sup>
	Guineo	5,4 <sup>c</sup>	14,6 <sup>d</sup>	10,9 <sup>a</sup>
Arachis	Melaza	4,7 <sup>a</sup>	4,9 <sup>a</sup>	13,3 <sup>a</sup>
	PCD	4,9 <sup>b</sup>	8,5 <sup>b</sup>	17,9 <sup>b</sup>
	Maíz	5,1 <sup>b</sup>	7,8 <sup>b</sup>	14,9 <sup>a</sup>
	Guineo	5,1 <sup>b</sup>	11,9 <sup>c</sup>	11,7 <sup>a</sup>
Cratylia	Melaza	4,8 <sup>a</sup>	7,8 <sup>b</sup>	20,7 <sup>b</sup>
	PCD	5,0 <sup>b</sup>	9,1 <sup>b</sup>	21,6 <sup>b</sup>
	Maíz	5,8 <sup>c</sup>	12,3 <sup>c</sup>	19,5 <sup>b</sup>
	Guineo	5,8 <sup>c</sup>	10,7 <sup>c</sup>	19,1 <sup>b</sup>
Erythrina	Melaza	4,5 <sup>a</sup>	4,7 <sup>a</sup>	20,0 <sup>b</sup>
	PCD	4,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>b</sup>	22,2 <sup>b</sup>
	Maíz	5,1 <sup>b</sup>	10,0 <sup>c</sup>	18,3 <sup>b</sup>
	Guineo	5,2 <sup>b</sup>	10,7 <sup>c</sup>	17,3 <sup>b</sup>
Leguminosa (L)		<0,0001	0,0050	<0,0001
Tipo de carbohidrato (C)		<0,0001	<0,0001	<0,0001
LxC		0,0014	<0,0001	-
E.E.***		0,1	0,8	1,1

\* Fuente de carbohidratos

\*\* Pulpa de cítricos deshidratada

\*\*\* Error estándar

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Los valores obtenidos en los tratamientos con melaza, son aceptables cuando se trabaja con materiales con bajo contenido de materia seca ( $< 20\%$  MS) (McDonald, 1981), mientras el resto de los tratamientos presentó valores de pH que permiten la proliferación de bacterias clostridiales, mohos y levaduras que reducen la calidad organoléptica y nutricional

del material conservado (Moore y Peterson, 1995). En complemento a lo anterior Kung y Shaver, (2001) indican que al ensilar forrajes de leguminosas con contenidos de materia seca menores a 30%, se obtienen valores de pH 4,6 – 4,8, que permiten procesos de fermentación clostridial; lo que sugiere que en todos los tratamientos pudo ocurrir pérdidas y degradación de nutrimentos, que afecten la calidad nutricional final del ensilado.

El aumento en el valor de pH final en los tratamientos ensilados con fuentes como el maíz, la pulpa de cítricos y el fruto de guineo cuadrado, puede ser debido a los carbohidratos agregados a la mezcla, es decir que, a pesar de uniformizar todos los tratamientos con único nivel de CNF, se debe considerar la fuente de carbohidratos dominante en los aditivos utilizados, ya que fuentes con menos contenidos de azúcares y mayor concentración de almidones no permiten adecuada conservación de los forrajes.

Esto concuerda con lo publicado por Rojas, (1985) quien señala que la acidificación durante el proceso de ensilaje inactiva las amilasas bacterianas, por tal motivo, los almidones no son aprovechados por las bacterias y por lo tanto no participan en el proceso de ensilaje. Por su parte, Jones, (1988) afirma que fue posible recuperar 90 – 100% del almidón de cebada y avena, adicionado a ensilados de pasto ryegrass (*Lolium sp.*). Además, Mülhbach (2001) señala que cuando se utilizó maíz como fuente de carbohidratos (5 – 10%p/p) en mezclas para ensilaje de pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) y *Desmodium uncinatum* fue posible mantener adecuada fermentación en el silo hasta con 30% de leguminosa en la mezcla. Además, indica que al utilizar niveles mayores a 30% de leguminosa, se debe complementar la mezcla con melazas para obtener una fermentación adecuada.

De esta manera, los valores de pH obtenidos en esta investigación son similares a los publicados por Tobía et al., (2008) (4,01 – 5,81) con ensilajes de soya sin adición de *Lactobacillus*. Pero mayores a los valores reportados por Mustafa y Seguin, (2003) (3,85 – 4,3) con ensilajes de Guisante (*Pisum sativum*), Haba (*Vicia faba*) y Soya (*Glicine max*), a los 45 días de ensilaje. También fueron mayores a los valores publicados en el trabajo de Krizsan y Randby, (2007) en ensilados de pastos de clima templado, salvo los tratamientos donde se utilizó melaza como fuente de carbohidratos, ya que estos presentaron valores similares. Estas diferencias se deben al bajo contenido de azúcares solubles en la pulpa de cítricos, y a la baja participación de los almidones como fuente de energía en el proceso de ensilaje.

### 3.5.2.2. Nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>/NT):

Al igual que con el pH, la fuente de carbohidratos generó diferencias ( $p < 0,05$ ) en la concentración de nitrógeno amoniacal de los tratamientos ensilados. También la especie de leguminosa generó diferencias ( $p < 0,05$ ) en la concentración de nitrógeno amoniacal (Cuadro 2). Los tratamientos donde se utilizó melaza, presentaron menores concentraciones de nitrógeno amoniacal debido a mayor acidificación durante el ensilaje. Al no acidificar el medio dentro del silo, aumenta la proliferación de bacterias, como las enterobacterias, cuyas proteasas degradan las proteínas mediante el proceso de desaminación. En esta investigación se detectó correlación positiva ( $\rho = 0,70$ ), entre la variable de pH y la concentración de nitrógeno amoniacal, situación que refuerza la necesidad de disminuir el pH, para evitar pérdidas de calidad del material forrajero; lo anterior coincide con los hallazgos realizados en el trabajo de Fransen y Strubi, (1998).

En lo que respecta a la especie de leguminosa, las diferencias tienen su origen en el contenido de humedad de la mezcla al inicio del ensilaje. De acuerdo a Hiriart, (2008) materiales con alto contenido de humedad ( $> 80\%$ ), poseen mayores concentraciones de nitrógeno amoniacal. De igual manera en esta investigación fue posible correlacionar ( $\rho = 0,75$ ) de manera significativa ( $p < 0,001$ ) el contenido de humedad y la concentración de nitrógeno amoniacal, esto coincide con lo reportados por Kung y Shaver, (2001) quienes señalan que ensilajes de forrajes con alto contenido de humedad ( $< 30\%$  MS), como los obtenidos en esta investigación (Cuadro 2), presentan mayores concentraciones de nitrógeno amoniacal debido a potenciales fermentaciones clostridiales; debido a esto son necesarias medidas que permitan aumentar el contenido de materia seca en las mezclas donde se utilicen estos forrajes.

Fransen y Strubi, (1998) obtuvieron concentraciones menores de nitrógeno amoniacal utilizando diferentes materiales absorbentes de humedad, además López-Herrera et al., (2009) (2,36 – 3,27%) y López-Herrera et al., (2015) (1,70 – 6,40%) indican que, cuando se utilizan aditivos con baja concentración de humedad, como la pulpa de cítricos y el heno, se reducen las pérdidas por nitrógeno amoniacal en el silo. A pesar de esto, se debe considerar la fuente de carbohidratos utilizada, la cantidad de carbohidrato agregado, la capacidad amortiguadora de las leguminosas y el contenido de humedad de la mezcla al inicio del proceso de ensilaje, motivo por el cual los valores obtenidos fueron mayores a los reportados en los trabajos citados anteriormente.

### 3.5.2.3. Ácidos orgánicos de los ensilados

Todos los ácidos orgánicos fueron afectados de manera significativa ( $p < 0,05$ ) por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos, a excepción del ácido propiónico que sólo presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) provocadas por la especie de leguminosa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración de ácidos orgánicos, en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	Láctico (%MS)	Acético (%MS)	Butírico (%MS)	Propiónico (%MS)
Vigna	Melaza	4,1 <sup>b</sup>	4,3 <sup>b</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,6 <sup>b</sup>
	PCD	0,8 <sup>a</sup>	6,3 <sup>c</sup>	1,2 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>
	Maíz	1,3 <sup>a</sup>	4,4 <sup>b</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,6 <sup>b</sup>
	Guineo	0,8 <sup>a</sup>	6,4 <sup>c</sup>	1,8 <sup>b</sup>	0,6 <sup>b</sup>
Arachis	Melaza	1,4 <sup>a</sup>	5,1 <sup>b</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>
	PCD	1,4 <sup>a</sup>	4,9 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	Maíz	2,0 <sup>a</sup>	5,6 <sup>b</sup>	1,2 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>
	Guineo	0,9 <sup>a</sup>	6,9 <sup>c</sup>	1,5 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>
Cratylia	Melaza	6,5 <sup>c</sup>	2,5 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	PCD	6,2 <sup>c</sup>	2,8 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	Maíz	4,4 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	Guineo	3,3 <sup>b</sup>	4,9 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
Erythrina	Melaza	5,4 <sup>c</sup>	4,5 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
	PCD	5,0 <sup>c</sup>	4,0 <sup>b</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	Maíz	3,8 <sup>b</sup>	4,2 <sup>b</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	Guineo	2,4 <sup>a</sup>	4,9 <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>
Leguminosa (L)		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tipo de carbohidrato (C)		<0,0001	<0,0001	0,0049	-
L*C		0,0001	<0,0001	<0,0001	-
E.E.**		0,41	0,30	0,16	0,06

Letras distintas en la misma columna son diferentes ( $p < 0,05$ )

\* Fuente de carbohidratos

\*\* Pulpa de cítricos deshidratada

\*\*\* Error estándar

Las diferencias en las concentraciones de ácidos orgánicos entre especies de leguminosas se derivan de la cantidad de humedad en el forraje. En esta investigación se determinaron correlaciones medias y altas entre el contenido de humedad del forraje y la concentración de los ácidos orgánicos en el ensilado, así, el ácido acético, el ácido butírico y el ácido propiónico presentaron correlaciones positivas ( $\rho = 0,70$ ,  $\rho = 0,62$  y  $\rho = 0,65$ , respectivamente), mientras que el ácido láctico presentó correlación negativa ( $\rho = -0,74$ ). Esto concuerda con los hallazgos de otras investigaciones donde se recomienda que los forrajes

altos en humedad deben recibir un proceso de pérdida de agua antes del proceso de ensilaje (Muck y Shinnars, 2001; Han et al., 2006).

También se determinaron correlaciones negativas entre ácidos, entonces, conforme aumenta la concentración del ácido acético, disminuye la concentración del ácido láctico ( $\rho=-0,73$ ) y cuando aumenta la cantidad de ácido butírico en el silo, se reduce la cantidad de ácido láctico ( $\rho=-0,70$ ). Esto coincide con lo publicado en McDonald (1981) e Hiriart (2008), quienes indican que, durante el ensilaje, la cantidad y el tipo de ácidos orgánicos producidos dependen de las poblaciones de bacterias presentes en el silo y que esto a su vez está determinado por la capacidad de acidificación de los ácidos producidos.

De acuerdo al análisis de contrastes, con respecto al ácido láctico el promedio producido por los tratamientos elaborados con leguminosas arbustivas fue mayor ( $p<0,001$ ) con respecto al de los tratamientos elaborados con leguminosas herbáceas (Figura 1). Esto se debe a que las leguminosas arbustivas poseen mayor contenido de materia seca, lo que favorece el crecimiento y actividad de las BPAL, situación que propicia la acidificación dentro del silo, que asegura un forraje de buena calidad (Kung y Shaver, 2001). A su vez, se determinó que en promedio, los tratamientos elaborados con *Cratylia* exhibió mayor producción de ácido láctico en comparación al de los ensilados de *Erythrina*. Esto puede ser debido al efecto de los carbohidratos solubles en el forraje, ya que no hay diferencias en el contenido de materia seca entre los tratamientos elaborados con estas leguminosas.

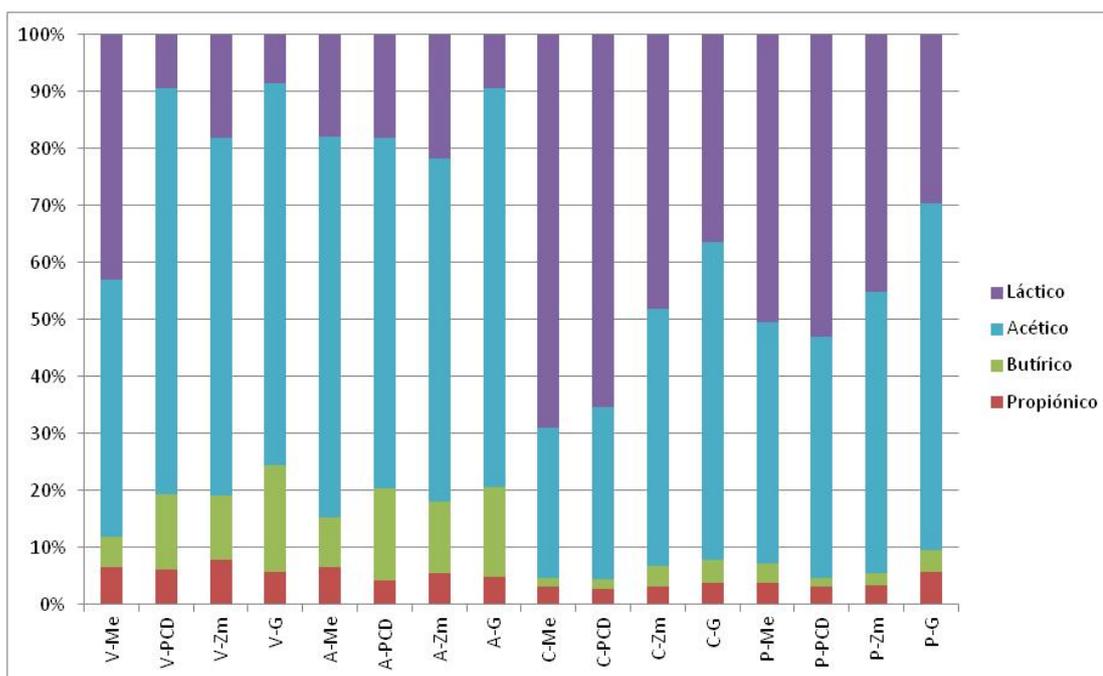


Figura 1. Proporciones de cada ácido orgánico en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

En cuanto al efecto de la fuente de carbohidratos, se comprobó que en promedio los tratamientos donde se utilizó melaza, presentaron las mayores producciones ( $p < 0,001$ ) de ácido láctico, en comparación con el promedio de los tratamientos elaborados con otras fuentes de carbohidratos. También se determinó que en promedio, los tratamientos con pulpa de cítricos deshidratada fueron los que registraron la segunda mejor producción de ácido láctico, con respecto al promedio de los tratamientos en los que se utilizaron fuentes almidonosas ( $p < 0,001$ ). Esto sugiere que hubo poca participación de los almidones como sustrato para las BPAL, de manera que el promedio de producción de ácido láctico para el maíz y el fruto de guineo cuadrado es el más bajo.

Finalmente, en el caso de la producción de ácido láctico esta fue mayor (1%,  $p < 0,001$ ) en los tratamientos donde se utilizó maíz y en los que se utilizó fruto de guineo cuadrado. Estas diferencias son debidas a la disponibilidad y velocidad con que las bacterias pueden convertir los carbohidratos en ácidos orgánicos y de esta manera, acidificar el medio para asegurar la conservación de la calidad del forraje (Jones, 1988; Yang et al., 2006).

En promedio por especie de leguminosa y por fuente de carbohidrato los valores de ácido láctico obtenidos en esta investigación fueron menores a los conseguidos por Fransen y Strubi (1998) (5,52 – 6,12 %MS), aunque similares a los reportados por Kung Jr et al., (2003) (3,61 – 4,45 %MS) con ensilados de alfalfa. Sin embargo, fueron menores a los valores encontrados por Van Man y Wiktorsson (2002) (9,9 – 9,9 %MS). Estas diferencias se deben al contenido de materia seca de los forrajes y el contenido de azúcares solubles en la mezcla, los cuales pueden aumentar o deprimir la producción del ácido láctico en el silo, tal y como se comentó con anterioridad.

La producción de ácido acético y ácido butírico aumenta cuando no se dan las condiciones favorables para la producción de ácido láctico (McDonald 1981). Así, el promedio de producción de los ácidos acético y butírico en los tratamientos elaborados con leguminosas herbáceas fue mayor ( $p < 0,01$ ) que en el promedio de los tratamientos elaborados con leguminosas arbustivas. No obstante, no se determinó diferencias entre los promedios de los tratamientos elaborados con leguminosas herbáceas. Además, la concentración de estos ácidos aumenta cuando se utilizan fuentes de carbohidratos almidonosas (Figura 1).

Todos los tratamientos a excepción de *Cratylia*-melaza y *Cratylia*-PCD presentan contenidos de ácido acético y butírico mayores a los reportados en el trabajo de Betancourt et al., (2005), considerados como ideales para ensilados de leguminosas de buena calidad. Esto puede ser debido al contenido de humedad en los forrajes, junto al efecto de la fuente de carbohidratos, lo que predispone mayores poblaciones de bacterias heterofermentativas que producen más cantidad de ácido acético, lo que reduce la calidad del proceso fermentativo (Elferink et al., 2005) y podría deprimir el consumo del ensilado cuando su concentración es mayor al 6% (Kung y Shaver, 2001); como ocurre con los tratamientos elaborados a partir de *Vigna* y *Arachis*, con guineo cuadrado como fuente de carbohidratos.

En cuanto al contenido de ácido butírico, los tratamientos elaborados a partir de leguminosas herbáceas, fueron los que presentaron mayor concentración de este ácido y sobre todo, los tratamientos donde se utilizaron almidones como aditivos; en estos tratamientos el coeficiente de correlación entre el contenido de ácido butírico y la cantidad de nitrógeno amoniacal presentó valores positivos  $\rho=0,69$  ( $p<0,001$ ), lo que sugiere malos procesos de conservación en el silo. Por este motivo no se deben utilizar estas mezclas en animales ya que se puede afectar negativamente su salud. De acuerdo a Cook et al., (2006) el consumo de ensilados con alta concentración de ácido butírico puede predisponer la aparición de cetosis tipo tres en cualquier momento de la lactancia temprana en vacas lecheras, por un aumento en la cantidad de BHB (beta-hidroxibutirato) en sangre.

### 3.6. CONCLUSIONES

Los ensilados de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos presentaron características organolépticas de calidad media a buena, estas diferencias fueron originadas por el grado de compactación del material, el contenido de materia seca y la capacidad amortiguadora de cada especie de leguminosa, además de la fuente de carbohidratos utilizada en la mezcla forrajera.

Los valores de pH y nitrógeno amoniacal presentaron niveles aceptables para ensilados tropicales, en especial cuando se utilizó melaza como fuente de carbohidratos, esto debido a su alto contenido de azúcares solubles (46% MS). Sin embargo, cuando se utilizó maíz y fruto de guineo cuadrado se detectaron los valores más elevados para estas variables, lo que presume pérdida de calidad en el forraje conservado. También se determinaron diferencias entre maíz y guineo cuadrado debido a que el maíz en grano posee aproximadamente 1,7% MS de azúcares, que pueden actuar durante el ensilaje, caso

contrario del fruto de guineo cuadrado que es solo almidón cuando está en estado inmaduro, tal y como se utilizó en este experimento.

La concentración de ácidos orgánicos en el ensilado está relacionada con los valores de pH y la concentración de nitrógeno amoniacal en los ensilados, por lo que son afectados por el contenido de materia seca, la capacidad amortiguadora del forraje y la concentración de carbohidratos solubles en la mezcla forrajera antes del ensilaje. De esta manera, cuando se utilizó melaza en la mezcla para ensilaje se propició la producción de ácido láctico, en detrimento de la concentración de los ácidos acético y butírico. Al utilizar fruto de guineo cuadrado inmaduro se obtuvo menor producción de ácido láctico y se incrementó la síntesis de los ácidos acético y butírico; el primero puede afectar el consumo voluntario del ensilado y el segundo provoca pérdidas de calidad en el material por descomposición.

### 3.7. LITERATURA CITADA

- Adesogan A.T. 2006. Factors affecting corn silage quality in hot and humid climates. In: Proceedings of the 17th Florida Ruminant Nutrition Symposium. February 1 – 2, 2006. University of Florida. United States. 108 – 127
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD, USA.
- Betancourt J.C. 2004. Caracterización nutricional y productiva de material fresco y ensilado de maní forrajero (*Arachis pinto*) cultivado en asocio con maíz (*Zea mays*), a tres densidades de siembra. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 110 p.
- Betancourt M., Gonzalez I., Martinez De Acuro M. 2005. Evaluación de la calidad de los ensilajes. Revista Digital Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. No8 mayo-agosto. Maracay, Aragua, Venezuela. 1-5 pp. Consultado en: [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/betancourt\\_m/betancourt\\_m.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/betancourt_m/betancourt_m.htm), el viernes 12 de enero de 2016 a las 9:15 am.
- Canale A., Valente M.E., Ciotti A. 1984. Determination of volatile carboxylic acids (C1 – C5i) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. Journal of the Science of Food and Agriculture 35(11): 1178 – 1182.
- Castillo M., Rojas-Bourrillon A., WingChing-Jones R. 2009. Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna (*Vigna radiata*). Agronomía Costarricense 33(1): 133 – 146.
- Cook N., Oetzel G., Nordlund K. 2006. Modern techniques for monitoring high-producing dairy cows: 2. Practical applications. In Practice-London-British Veterinary Association 28(10): 598 – 603.
- Cubero, J.F., A. Rojas-Bourrillón y R. Wingching 2010. Uso del inóculo microbio elaborado en finca en ensilaje de maíz (*Zea mays*). Valor nutricional y fermentativo. Agron. Costarric. 34(2): 237-250.
- Davies D.R., Merry R.J., Williams A.P., Bakewell E.L., Leemans D.K., Tweed J.K.S. 1998. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. Journal of Dairy Science 81(2): 444 – 453.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez., M. Tablada y Y.C. Robledo. 2015. Infostat versión 2015. Grupo infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [Http://www. Infostat. Com. Ar.](http://www.infostat.com.ar)
- Driehuis F., van Wixselaar P.G. 2000. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high dry matter grass silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 80(6): 711 – 718.

- Elferink O., Driehuis F., Gottschal J. C., Spoelstra S.F. 2005. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Institute for Animal Science and Health. Holanda. 1 – 14.
- Elizondo-Salazar J.A., Campos-Granados C.M. 2014. Características nutricionales de la cáscara de piña ensilada con cantidades crecientes de urea y heno. *Nutrición Animal Tropical* 8(2): 51- 71.
- Ewen A. 2011. Organic acids in silage: Application note. Agilent Technologies. Estados Unidos. 3p.
- Fransen S.C., Strubi F.J. 1998. Relationships among absorbents on the reduction of grass silage effluent and silage quality. *Journal of Dairy Science* 81(10): 2633 – 2644.
- Giger-Riverdin S., Duvaux-Ponter C., Sauvant D., Martin O., Nunes Do Prado I., Müller R. 2002. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 96: 83-102
- Han K.J., Collins M., Vanzant E.S., Dougherty C.T. 2006. Characteristics of baled silage made from first and second harvests of wilted and severely wilted forages. *Grass and Forage Science* 61(1): 22 – 31.
- Hiriart M. 2008. Ensilados. Procesamiento y Calidad. Editorial Trillas. México. 110p.
- Jones, D.I.H. 1988. The effect of cereal incorporation on the fermentation of spring-and autumn-cut silages in laboratory silos. *Grass and Forage Science* 43: 167–172.
- Jones, R., Jones, D.I.H. 1996. The effect of in-silo effluent absorbents on effluent production and silage quality. *Journal of Agricultural Engineering Research* 64(3): 173-186.
- Krizsan S.J., Randby A.T. 2007. The effect of fermentation quality on the voluntary intake of grass silage by growing cattle fed silage as the sole feed. *Journal of Animal Science* 85(4): 984 – 996.
- Kung L., Ranjit N.K. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science* 84(5): 1149 – 1155.
- Kung L., Shaver R. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on forage*: 3(13): 1 – 5.
- Kung L., Taylor C.C., Lynch M.P., Neylon J.M. 2003. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86(1): 336 – 343.
- López-Herrera, M., R. WingChing y A. Rojas-Bourrillon. 2009. Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas comosus*). *Agronomía Costarricense* 33(1): 1 – 15.
- López-Herrera, M., R. WingChing, A. Rojas-Bourrillon y S. Rodríguez. 2015. Valoración nutricional de ensilajes de corona de piña con adición de heno y urea. *Nutrición Animal Tropical* 9(2): 65-90.

- McDonald P. 1981. The biochemistry of silage. John Wiley, New York.
- McDonald P., Henderson A.R. 1962. Buffering capacities of herbage samples as factor of silage. *Journal of Science Food and Agriculture* 13:395-400.
- Moore K.J., Peterson M.A. 1995. Post-harvest physiology and preservation of forages. *Crop Science Society of America Inc. Special publication N.º 22. Wisconsin, USA.* 91-107 p.
- Muck R.E., Shinnors K.J. 2001. Conserved forage (silage and hay): progress and priorities. In: *International Grassland Congress, XIX. Brazilian Society of Animal Husbandry São Pedro, Brazil.* 753 – 762.
- Mühlbach P.R. 2001. Uso de aditivos para mejorar el ensilaje de los forrajes tropicales. In: *Memorias de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. Estudio FAO producción y protección vegetal 161: 157 – 171.*
- Mustafa A.F., Seguin P. 2003. Characteristics and in situ degradability of whole crop faba bean, pea, and soybean silages. *Canadian Journal of Animal Science* 83(4): 793 – 799.
- Playne M. J., McDonald P. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17: 264 – 268
- Rojas-Bourrillon A. 1985. Effect of rolled corn silage on digestion of nutrients and feedlot performance of growing steers. Tesis de Maestría. Iowa State University. United States. 93p.
- Tobia C. 2004. Introducción del ensilaje de soya en un sistema de producción intensiva de leche en el trópico húmedo de Costa Rica. Tesis de Doctorado. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 120 p
- Tobia C., Villalobos E. 2004. Producción y valor nutricional del forraje de soya en condiciones tropicales adversas. *Revista Agronomía Costarricense* 28(1): 17 – 25.
- Tobia C., Villalobos E., Rojas A., Soto H., Moore K.J. 2008. Nutritional value of soybean (*Glycine max* L. Merr.) silage fermented with molasses and inoculated with *Lactobacillus brevis* 3. *Livestock Research for Rural Development* 20(7): 1 – 9.
- Van Man N., Wiktorsson H. 2002. Effect of molasses on nutritional quality of cassava and gliricidia tops silage. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 15(9): 1294 – 1299.
- Vargas R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37p
- Yang H.Y., Wang X.F., Liu J.B., Gao L.J., Ishii M., Igarashi Y., Cui Z.J. 2006. Effects of water-soluble carbohydrate content on silage fermentation of wheat straw. *Journal of bioscience and bioengineering* 101(3): 232 – 237.

## **CAPITULO 4.**

### **EFFECTO DE LA ESPECIE LEGUMINOSA, LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS Y EL ENSILAJE EN EL VALOR NUTRICIONAL DE MEZCLAS FORRAJERAS**

## CAPITULO 4. EFECTO DE LA ESPECIE LEGUMINOSA, LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS Y EL ENSILAJE EN EL VALOR NUTRICIONAL DE MEZCLAS FORRAJERAS

### 4.1. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar las características nutricionales de mezclas frescas y ensiladas elaboradas a partir de leguminosas y cuatro fuentes de carbohidratos. los forrajes fueron cosechados en Upala, Costa Rica El experimento fue realizado entre 2015 y 2016, , Los forrajes fueron picados para obtener partículas promedio de 3 cm, y colocadas en bolsas de empaque al vacío, con capacidad para 5 kg ahí se combinaron en un arreglo multifactorial 4x4x2, cuatro especies de leguminosas (*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea*, *Erythrina poeppigiana*), 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido y fruto inmaduro de guineo cuadrado) y dos formas de procesamiento del forraje (fresco, ensilado), para un total de 32 tratamientos. A todos los tratamientos se les agregó inóculo bacteriano artesanal (1 L/t). la parte experimental se desarrolló en Montes de Oca. Las leguminosas arbustivas frescas y ensiladas presentaron en promedio 6,6 % más de materia seca, 8,5 % más de FDN y 4,6 % de FDA; que las leguminosas herbáceas, esto debido al efecto de edad del forraje. También se determinó que existen diferencias significativas entre el material fresco y el ensilado, así la materia seca se reduce 4,2%, debido a retención de los efluentes en el silo, mientras la hemicelulosa y la celulosa se reducen 32% y 14,1%; respectivamente, por la actividad de los microorganismos durante el ensilaje. El contenido de proteína cruda se reduce 3,6% debido a pérdidas en forma de nitrógeno amoniacal al pasar de material fresco a ensilado. No obstante, la concentración de CNF aumenta 29,5% debido a la reducción de la proteína y fibra lo que afecta la estimación de esta fracción. También el TND aumenta al pasar de fresco a ensilado, sin embargo el cambio no resulta importante ya que el valor de lignina se mantiene constante. Se estimó que los materiales ensilados permiten la producción diaria de 1,3 kg leche/vaca, al consumir 5 kg material verde (MV)/animal/día y 4,0 kg leche /vaca, al consumir 15 kg MV/animal/día.

**Palabras clave:** conservación de forrajes, forrajes tropicales, aditivos, nutrición animal

## 4.2. ABSTRACT

**Effect of the legume species, the source of carbohydrates and the forage process in the nutritional value of silage mixtures.** The objective of this research was to determine the nutritional value of fresh and silage mixtures made with legumes and four sources of carbohydrates. The experiment was carried out between 2015 and 2016, the forages were harvested in Upala, Costa Rica, however the experimental part was developed in Montes de Oca, Costa Rica. The forages were chopped to obtain a particle size of 3 cm, and placed in vacuum packing bags, with capacity for 5 kg, there were combined in a 4x4x2 multifactorial arrangement with four legume species (*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoii*, *Cratylia argentea*, *Erythrina poeppigiana*), 4 carbohydrate sources (sugar cane molasses, dehydrated citrus pulp, ground corn, and immature saba banana fruit) and two forms of forage processing (fresh, ensiled) for 32 treatments. Bacterial inoculum (1 L / t) was added to all treatments. Fresh and silage shrub legumes showed an average of 6.6 % more dry matter, 8.5 % more NDF and 4.6 % of FDA than herbaceous legumes, this due to an age effect of forage. It was also determined that there are differences between the fresh material and silage, thus the dry matter is reduced by 4.2%, due to retention of the effluents in the silo, while hemicellulose and cellulose are reduced by 32% on average and 14.1% respectively, by the activity of the microorganisms during silage. The crude protein content is reduced by 3.6% due to losses in the form of ammoniacal nitrogen when passing from fresh to ensiled material. However, the concentration of CNF increases 29.5% because the reduction of protein and fiber affects the estimation of this fraction. Also the TND increases when moving from fresh to silage, however the change is not important as the value of lignin remains constant regardless of the forage processing. It was estimated that the ensiled materials allow a daily production of 1.3 kg milk/cow, consuming 5 kg fresh matter (FM)/animal/day and 4.0 kg milk/cow, consuming 15 kg FM/animal/day.

**Keywords:** forage conservation, tropical forages, additives, animal nutrition

### 4.3. INTRODUCCIÓN

El uso de especies arbóreas y arbustivas leguminosas como complemento alimenticio de dietas en base a pastos, es una actividad común en los países tropicales (Camero y Franco, 2001). La concentración de proteína de las leguminosas y los árboles utilizados en la alimentación de rumiantes está entre 12 y 30%, esto permite mejorar el consumo de energía y proteína del animal, situación que mejora el desempeño productivo de los animales (Holmann y Lascano, 2001; Devendra y Pezo, 2001). Sin embargo, la digestibilidad de estos materiales está muy relacionada con la proporción y grado de lignificación de las paredes celulares (fibra), así como de la presencia de compuestos secundarios, principalmente taninos (Flores et al., 1998).

El uso de leguminosas en los sistemas de producción del trópico se ha extendido como estrategia para reducir el uso de alimentos balanceados de alto costo (Tobía et al., 2004). Se plantean el uso de las leguminosas con sistemas de corte y acarreo, en sistemas silvopastoriles: como bancos de proteína o cercas vivas (Pezo e Ibrahim, 1998), aunque también se utilizan plantaciones de leguminosas forrajeras en monocultivo o asociadas para conservar mediante la técnica del ensilaje (Tobía et al., 2004).

El ensilaje es una técnica de conservación de forraje por vía húmeda, que consiste en almacenar forrajes en estado verde en ausencia de oxígeno, donde ocurren transformaciones químicas y físicas que definen su calidad (Hiriart, 2008). Este proceso se logra por medio de la fermentación láctica espontánea inducida por la microflora epífita en los forrajes, en particular las bacterias productoras de ácido láctico (BPAL) (Davies et al., 1998) bajo condiciones anaeróbicas (Elferink et al., 2005).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la fuente de carbohidratos, la especie de leguminosa y el ensilaje en la composición bromatológica de mezclas forrajeras elaboradas con 4 leguminosas y 4 fuentes de carbohidratos.

## 4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.4.1. Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Campus Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca, donde se encuentran los laboratorios de Centro de Investigaciones en Nutrición Animal (CINA) para análisis bromatológicos de forrajes. Los forrajes utilizados fueron cosechados en la finca Agroecológica Vocaré ubicada en el cantón de Upala a 180 msnm, con una precipitación promedio de 2500 mm anuales y una temperatura promedio de 25 °C.

### 4.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas

Las edades de corte de las leguminosas se fijaron de acuerdo a la hábito de crecimiento de las plantas (herbácea o arbustiva), además se consideró la edad de rebrote, con la finalidad de no utilizar forrajes muy maduros con alto contenido de fibra y lignina. Las edades de corte utilizadas fueron: *Vigna radiata* (40 días), *Arachis pintoi* (40 días), *Cratylia argentea* (75 días) y *Erythrina poeppigiana* (75 días). Las especies arbustivas fueron cosechadas a 1,20m de altura, mientras que las leguminosas herbáceas fueron cosechadas al nivel de suelo.

Los niveles de inclusión de las fuentes de carbohidratos fueron: melaza (6,3% p/p), pulpa de cítricos deshidratada (8,4% p/p), maíz molido (6,4% p/p) y fruto inmaduro de guineo cuadrado (*Musa acuminata x balbisiana*, Grupo ABB) (6,7% p/p) de manera que provean 5% del total de carbohidratos no fibrosos de la mezcla forrajera. El 5% restante para alcanzar el 10 – 15% de carbohidratos no fibrosos, fue provisto por las leguminosas. El fruto inmaduro de guineo cuadrado se encontraba en estado inmaduro y completamente engrosado al momento de la cosecha.

### 4.4.3. Diseño experimental y tratamientos

Para este experimento se utilizó un diseño multifactorial completamente aleatorizado (4x4x2). En él se combinaron cuatro fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada (PCD), maíz molido y fruto de guineo cuadrado) con cuatro especies leguminosas (*Vigna radiata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana*) y dos formas de procesamiento del forraje (fresco, ensilado) Se uniformizó que

todos los tratamientos presentaran 10% de carbohidratos no fibrosos para asegurar una adecuada fermentación de acuerdo a lo planteado por Vargas, (1979) e Hiriart, (2008).

A todos los tratamientos se les agregó inóculo bacteriano artesanal (elaborado por fermentación anaeróbica durante 30 días, a partir de suero de leche, leche y melaza – *Lactobacillus*  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL) (1L/tonelada) con base en el peso en fresco. Cada tratamiento ensilado fue repetido 4 veces, mientras que de los tratamientos sin ensilar se elaboraron 3 repeticiones para un total de 112 microsilos. Cada bolsa se consideró como una unidad experimental

#### *4.4.4. Procedimiento experimental*

Se tomó muestras de 2kg de material fresco por triplicado, para analizar la calidad nutritiva de la mezcla antes del ensilaje, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se transportaron por vehículo para ser analizadas en el laboratorio de bromatología de forrajes del CINA.

Para la conservación de los tratamientos se utilizó la técnica de microsilos con bolsas de polietileno para empaque al vacío con capacidad para 5kg y con un grosor de 0,0063 mm, cada bolsa se llenó con aproximadamente 4kg de mezcla para ensilar. El material una vez depositado y compactado a mano, se extrajo el aire a fondo con una aspiradora. Posterior a la eliminación del oxígeno, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se colocaron en condiciones de laboratorio (25°C, 75% humedad relativa, aproximadamente) por 50 días, de manera que estuvieran protegidas del ataque de aves, roedores o labores rutinarias que podrían perjudicar el proceso de ensilaje.

#### *4.4.5. Variables a evaluar*

A los 50 días de fermentación se realizó la apertura de los silos, momento en el que se trasladó el material al laboratorio para determinar: el porcentaje de Materia Seca (MS) en estufa a 60 °C durante 48 horas, el de Proteína Cruda (PC) mediante el método de Kjeldahl, Extracto Etéreo (EE) y Cenizas (AOAC, 1998), Carbohidratos no Fibrosos (CNF), por el método descrito en las tablas de requerimientos para ganado lechero del National Research Council (NRC) (NRC, 2001). También se realizaron los análisis de Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA) y la Lignina (Van Soest y Robertson, 1985). Finalmente, el contenido de NDT (Nutrientes Digestibles Totales) se estimó utilizando la

metodología propuesta por Weiss (2004), mientras que la energía neta de lactancia se estimó mediante las ecuaciones propuestas por el NRC (2001).

Se calculó el aporte de la PC y la Energía Neta de Lactación ( $EN_L$ ) de cada una de las mezclas ensiladas, con base en tres niveles de consumo de material verde (MV) (5, 10 y 15 kg MV/vaca/día), los resultados obtenidos fueron comparados con los requerimientos para la producción de leche de una vaca de 454Kg publicados en las tablas de requerimientos del NRC (2001).

#### *4.4.6. Análisis de la información*

El análisis de la información se realizó con un Modelo ANOVA de INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2015) considerando como efectos principales: la forma de procesamiento del forraje, la fuente de carbohidratos, la especie de leguminosa y la interacción de todas las fuentes principales. Para la comparación entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

### **4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### *4.5.1. Materia seca y componentes celulares*

El contenido de materia seca de los materiales fue influenciado por la interacción entre la especie de leguminosa y el ensilaje, también fue afectado por la interacción entre la fuente de carbohidrato y la forma de procesamiento del forraje. Ambos efectos generan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 1). Este resultado proviene de la combinación de efectos generados por la edad del forraje, el contenido de materia seca en cada uno de los aditivos utilizados y además depende de que haya ocurrido un adecuado proceso de ensilaje, para evitar la producción de efluentes en el silo.

La materia seca de las mezclas frescas fue menor al 35%; de acuerdo a Kung y Shaver (2001) esto incrementa el riesgo de pérdidas de nutrimentos por formación de efluentes, aumenta los valores finales de pH ( $> 4,50$ ) y acrecienta la formación de nitrógeno amoniacal (Hiriart, 2008). Además, McDonald (1981) señala que para evitar pérdidas por efluentes cuando se trabaja con forrajes altos en humedad ( $< 35\%$  MS) se debe aumentar la cantidad de carbohidratos solubles disponibles para los microorganismos en el ensilaje.

Cuadro 1. Valores de materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EEt) y cenizas (CEN), de las mezclas, en forma fresca antes del ensilaje y con 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Forraje	Leguminosa	CHO*	MS** (%)	PC** (% MS)	EEt** (% MS)	CEN** (% MS)
Fresco	Vigna	Melaza	13,5	14,4	2,6	11,7
		PCD*	17,3	12,4	3,8	7,9
		Maíz	13,1	15,1	3,2	7,9
		Guineo	10,9	13,6	3,2	8,5
	Arachis	Melaza	13,3	18,3	2,4	11,2
		PCD	17,8	15,6	2,6	9,5
		Maíz	14,9	19,2	2,7	9,2
		Guineo	11,7	20,5	2,7	11,4
	Cratylia	Melaza	20,7	17,5	2,7	9,8
		PCD	21,6	17,3	2,6	7,9
		Maíz	19,5	19,3	2,5	7,6
		Guineo	19,1	20,1	2,8	7,3
	Erythina	Melaza	20,0	16,5	2,6	9,1
		PCD	22,2	15,7	2,1	7,8
		Maíz	18,3	17,2	2,5	8,1
		Guineo	17,3	17,2	2,5	7,9
Ensilado	Vigna	Melaza	12,5	15,5	4,0	11,6
		PCD	12,9	14,8	3,9	9,4
		Maíz	12,0	15,9	4,2	8,2
		Guineo	10,7	13,9	3,7	9,9
	Arachis	Melaza	13,3	19,4	3,9	12,7
		PCD	14,3	17,4	4,1	10,5
		Maíz	14,1	17,9	4,5	9,0
		Guineo	10,8	17,8	4,8	11,7
	Cratylia	Melaza	21,9	15,8	4,5	9,5
		PCD	21,8	16,5	4,5	7,9
		Maíz	22,4	16,1	4,2	7,1
		Guineo	18,6	16,5	4,0	7,6
	Erythina	Melaza	19,4	16,7	4,7	10,2
		PCD	19,6	16,1	4,7	8,9
		Maíz	19,6	15,2	4,4	7,6
		Guineo	16,4	15,4	4,2	8,8
Valor de p						
	Leguminosa (L)		<0,0001	<0,0001	-	<0,0001
	CHO (C)		<0,0001	0,0032	-	<0,0001
	Forraje (F)		0,0141	0,0319	<0,0001	0,0040
	L*C		-	-	0,0383	0,0063
	L*F		0,0077	0,0001	<0,0001	-
	F*C		0,0014	0,0004	-	-
	F*L*C		-	-	-	-
	E.E.***		0,84	0,78	0,21	0,43

\* Fuentes de carbohidratos, PCD=pulpa de cítricos deshidratada

\*\* Materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EEt), cenizas (CEN)

\*\*\*Error estándar

Esto coincide con los resultados obtenidos en el capítulo anterior ya que todos los ensilados presentaron valores de pH mayor a 4,5, sin embargo los tratamientos donde se utilizó melaza presentaron concentraciones menores a 7,0% nitrógeno amoniacal, debido al aporte de carbohidratos solubles que hace esta fuente. El resto de los tratamientos presentaron concentraciones de nitrógeno amoniacal mayores a 7,0%, debido a su bajo o nulo aporte de carbohidratos solubles en agua. En lo que respecta a la producción de efluentes, no se pudo cuantificar las pérdidas debido a que la técnica de microsilos utilizada limita esta medición, lo que coincide con lo publicado por López-Herrera et al., (2009).

Los ensilados elaborados con Vigna y Arachis presentaron niveles de materia seca menores a los indicados por Castillo et al., (2009) (21,7%), Betancourt (2004) y Cubero et al., (2010) (18,4%). Sin embargo, en los tratamientos donde se utilizaron las especies arbustivas se obtuvieron niveles comparables a los obtenidos por estos autores. Todos los tratamientos presentaron menor concentración de materia seca con respecto a los datos reportados por Tobía et al., (2004) con ensilados de maíz (24,5%) y de soya (27,5%). Estas diferencias provienen de la especie forrajera, la edad de cosecha del forraje y de que haya ocurrido un adecuado proceso de ensilaje, para evitar la producción de efluentes en el silo.

En cuanto al contenido de proteína cruda de los tratamientos, se presentaron diferencias ( $p < 0,05$ ), que fueron influenciadas por la interacción entre la especie de leguminosa y el ensilaje también por la interacción entre la fuente de carbohidratos y el ensilaje (Cuadro 1). De esta manera el promedio de los tratamientos con inclusión de melaza presentó mayor concentración de proteína en comparación con los promedios de los tratamientos que contienen otras fuentes de carbohidratos, esto debido a la menor concentración de proteína en los aditivos utilizados, además mayores pérdidas posibles en forma de nitrógeno amoniacal, debido a la poca o nula participación de los almidones en el ensilaje.

Los valores de proteína cruda obtenidos en todos los tratamientos evaluados son mayores que los indicados por Castillo et al., (2009) (8,88 – 11,36 %MS) con ensilados de Maíz asociado con Vigna. También fueron mayores a los resultados reportados por Heinritz et al., (2012) (2,01 – 14,96 %MS). Además, todos los tratamientos, menos donde se utilizó la vigna como fuente forrajera, fueron comparables a los valores reportados por Tobía et al., (2004) (17,00 %MS) con ensilados de soya. Asimismo, los tratamientos frescos fueron comparables a los resultados obtenidos por WingChing y Rojas, (2006) (16,89 – 20,41 %MS), mientras que los tratamientos ensilados fueron menores. Todos los tratamientos ensilados presentaron concentraciones de proteína cruda menores a los valores obtenidos

por Berndt, (2002) (19,47 – 19,63 %MS) en ensilados de alfalfa. Las diferencias entre ensayos se explican por ser diferentes especies forrajeras, el manejo de la fertilización, las edades de rebrote y cosecha de los forrajes, además del contenido de proteína en la fuente de carbohidratos.

En la Figura 1 se puede observar el potencial productivo de los tratamientos ensilados comparados con los ensilados de maíz y de soya elaborados en la investigación de Tobía et al., (2004). Al utilizar el requerimiento de proteína para producir un kilogramo de leche y estimar el aporte de proteína de los ensilados, se puede observar que los tratamientos permitirían producir entre 1,91 y 4,62 kg leche/vaca/día, cuando se consumen 15 kg MV/vaca/día y no más de 1,54 kg leche/vaca/día, cuando el consumo es de 5 kg MV/vaca/día.

También es posible apreciar que todos los tratamientos, salvo el tratamiento Vigna+fruto de guineo cuadrado, permiten mayor producción de leche comparados con los ensilados de maíz, aunque menor que los ensilados de soya (Tobía et al., 2004). Lo anterior sugiere que las mezclas forrajeras analizadas pueden considerarse materiales forrajeros de buena calidad, aunque utilizados como complemento dentro de una ración balanceada.

La concentración de extracto etéreo en los tratamientos fue afectada por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos utilizada ( $p < 0,0383$ ), además de la interacción entre la especie de leguminosa y el ensilaje ( $p < 0,0001$ ). Estos efectos se deben a la concentración de esta fracción en las especies de leguminosas, donde las leñosas presentaron mayor concentración, con respecto a las herbáceas. Además, cada uno de los carbohidratos adicionados, también presentan diferentes concentraciones de esta fracción, por lo que pueden afectar el contenido final de la mezcla ensilada.

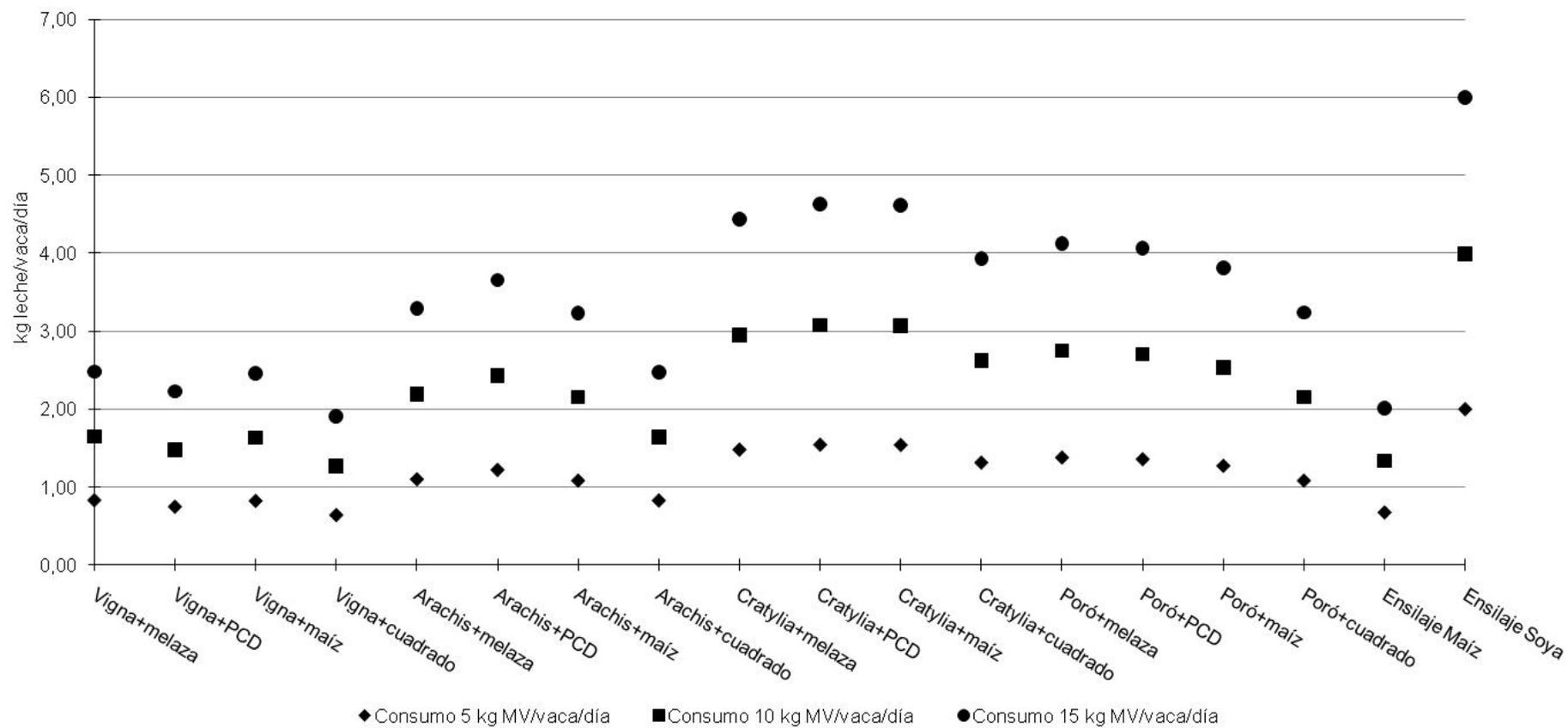


Figura 1. Potencial productivo (por requerimiento de proteína) en kg de leche/vaca/día de los tratamientos ensilados comparados con ensilados de maíz y soya, de acuerdo al nivel de consumo de Materia verde (MV) (5, 10 y 15 kg MV/día). San José, Costa Rica 2016

En cuanto al efecto del ensilaje, durante este se aumenta la cantidad de ácidos orgánicos, principalmente ácidos grasos volátiles: acético, propiónico, butírico e isobutírico, valérico e isovalérico y el láctico (no volátil) (Fussell y McCalley, 1987), que pueden ser extraídos con el éter durante el análisis de extracto etéreo (Drucker, 1970), tal y como se observa en el Cuadro 1. Los valores de extracto etéreo de todos los tratamientos evaluados son mayores a los reportados en la investigación de Castillo et al., (2009) (1,39 – 1,98% MS). Esta diferencia puede ser debida a la especie forrajera, sin embargo Church et al., (2003) indican que el extracto etéreo en forrajes no es una fracción de importancia debido a que durante la extracción con éter se disuelven componentes, como las ceras, que no resultan de calidad para la alimentación del rumiante.

La concentración de la fracción mineral, fue afectada por la interacción de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos, además, por el efecto del ensilaje (Cuadro 1). Los tratamientos con inclusión de melaza presentaron mayores concentraciones de cenizas en comparación con los que contienen otras fuentes de carbohidratos, esto debido a la menor concentración de cenizas en los aditivos utilizados. Mientras que el efecto de la especie de leguminosa se da por las diferencias en el contenido de la fracción mineral en cada especie. En este caso las especies herbáceas poseen mayor contenido de cenizas que las especies leñosas, esto puede ser debido al mayor contenido celular de minerales en la planta o a la presencia de raíces al momento de la cosecha.

Los tratamientos evaluados presentaron valores de cenizas comparables a los resultados obtenidos por Mustafa y Seguin, (2003) (8,0 – 10,2 %MS) en ensilados de diferentes leguminosas y a los reportados por WingChing y Rojas, (2006). Sin embargo, fueron mayores a los resultados obtenidos por Castillo et al., (2009) (5,7 – 7,5% MS) con ensilados de maíz-vigna en diferentes proporciones.

#### *4.5.2. Componentes de la pared celular*

En el Cuadro 2 se pueden observar los resultados del fraccionamiento de los componentes de la pared celular y los carbohidratos no fibrosos.

Cuadro 2. Fraccionamiento de los carbohidratos fibrosos y no fibrosos de las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, en forma fresca antes del ensilaje y con 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Forraje	Leguminosa	CHO*	FDN** (% MS)	FDA** (% MS)	LIG** (% MS)	HEM** (% MS)	CEL** (% MS)	CNF** (% MS)	
Fresco	Vigna	Melaza	37,6	27,9	5,9	9,7	21,9	33,7	
		PCD	45,9	33,2	5,4	12,7	27,8	30,0	
		Maíz	38,5	26,2	4,7	12,2	21,4	35,3	
		Guineo	43,2	32,0	7,4	11,1	24,6	31,7	
	Arachis	Melaza	38,4	25,5	5,5	12,9	19,9	29,7	
		PCD	43,8	29,3	5,9	14,5	23,4	28,5	
		Maíz	42,8	26,5	6,2	16,2	20,3	26,1	
		Guineo	46,3	31,2	8,7	15,2	22,5	19,0	
	Cratylia	Melaza	50,2	32,4	9,4	17,9	22,9	19,8	
		PCD	51,6	33,1	10,8	18,5	22,3	20,6	
		Maíz	55,0	34,6	13,2	20,4	21,4	15,6	
		Guineo	55,9	36,6	13,9	19,3	22,7	13,9	
	Erythina	Melaza	49,9	34,5	10,3	15,5	24,2	21,8	
		PCD	47,7	32,2	9,9	15,5	22,2	26,8	
		Maíz	55,3	37,1	13,0	18,2	24,1	16,9	
		Guineo	56,9	36,0	12,4	20,9	23,6	15,4	
	Ensilado	Vigna	Melaza	35,9	25,3	5,6	10,6	19,7	37,4
			PCD	44,1	34,8	6,6	9,2	28,2	32,3
			Maíz	36,7	27,3	5,5	9,4	21,8	39,1
			Guineo	47,3	38,2	8,5	9,1	29,7	30,3
Arachis		Melaza	36,2	25,0	6,7	11,2	18,3	36,2	
		PCD	36,2	26,8	5,8	9,4	21,0	38,3	
		Maíz	31,9	21,6	4,9	10,3	16,7	44,4	
		Guineo	41,7	30,9	8,2	10,9	22,6	31,9	
Cratylia		Melaza	44,3	31,1	11,2	13,2	19,9	32,0	
		PCD	48,4	33,4	12,5	15,0	20,9	29,5	
		Maíz	42,9	29,3	11,3	13,7	18,0	35,4	
		Guineo	44,9	31,5	11,6	13,4	19,9	32,4	
Erythina		Melaza	42,5	31,0	10,0	11,5	21,0	32,1	
		PCD	46,4	34,6	11,6	11,8	23,0	29,9	
		Maíz	42,7	31,6	10,6	11,1	20,9	34,7	
		Guineo	47,9	36,5	12,6	11,4	23,9	29,6	
Valor de p									
Leguminosa			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
CHO			<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0055	<0,0001	0,0001	
Forraje			<0,0001	0,0395	-	<0,0001	0,0061	<0,0001	
L*C			-	0,0110	0,0477	-	0,0010	-	
L*F			0,0005	0,0474	-	<0,0001	0,0362	<0,0001	
F*C			0,0190	0,0388	0,0031	<0,0001	0,0300	0,0024	
F*L*C			-	-	-	-	-	-	
E.E.			1,82	1,51	0,60	0,67	1,13	2,18	

\* Fuente de carbohidratos

\*\*Fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), hemicelulosa (HEM), celulosa (CEL), lignina (LIG) y carbohidratos no fibrosos (CNF)

\*\*\*Error estándar

El contenido de fibra detergente neutra de los tratamientos fue afectado ( $p < 0,05$ ), por la interacción entre el procesamiento del forraje y la especie de leguminosa, también fue influenciado por la interacción entre la fuente de

carbohidratos y el procesamiento del forraje (Cuadro 2). Esto se debe a que el contenido de fibra es mayor en las especies leñosas que en las especies herbáceas, consecuencia de mayor concentración de hemicelulosa en la fracción fibrosa. Se pudo estimar que las especies arbustivas poseen en promedio 7,9 % más de hemicelulosa que las especies herbáceas, ya sea en fresco o ensilado.

La fuente de carbohidratos afecta debido a la composición propia del aditivo, ya que todos tienen menor contenido de fibra detergente neutro con respecto al forraje de leguminosa utilizado. Además, durante el proceso de ensilaje las bacterias presentes consumen parte de los carbohidratos no fibrosos y parte de la hemicelulosa presente en la mezcla, lo que disminuye el contenido de fibra en el forraje (McDonald, 1981, Ramírez et al., 2002).

Los valores de fibra detergente neutro de los tratamientos fueron comparables a los datos reportados por Richards et al., (1994) (35,1 y 41,1 %MS) para ensilajes de *Leucaena leucocephala* y *Gliricidia sepium*, respectivamente. También fueron similares a los valores reportados por García et al., (1996) (34,0 – 42,0 %MS) para ensilados de *Leucaena leucocephala* y a los indicados por Bernal et al., (2008) (39,5 y 59,1 %MS) para ensilados de *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea*, respectivamente.

En el Cuadro 3 se puede observar que la disminución en el contenido de fibra detergente neutro de las mezclas fluctuó entre 2,7 y 25,4%, aunque incrementó en la mezcla de *Vigna* con guineo. Además, al analizar los contenidos de FND en el Cuadro 2, se puede observar que la fracción que más se reduce es la hemicelulosa ya que disminuye entre 18,7 y 45,9%, lo que coincide con lo publicado por McDonald (1981). Finalmente, la celulosa también participa como fuente de energía para los microorganismos en el ensilaje, esto depende de la disponibilidad de otros sustratos en el silo y la actividad de las enzimas fibrolíticas, las cuales tienen un rango de acción entre valores de pH de 4,0 – 6,8 (Colombatto et al., 2004), sin embargo esta afirmación requiere de más estudio.

De acuerdo a los valores de pH registrados en esta investigación (4,5 – 5,8) es posible que parte de la celulosa haya podido ser degradada por actividad enzimática, en los casos donde no ocurrió reducción se puede decir que no hay suficiente cantidad de enzima debido a menor crecimiento de bacterias con esta habilidad. Tal y como lo indica Eun et al., (2007), la cantidad de inóculo es muy importante en la actividad de las enzimas fibrolíticas. Esta actividad es de importancia en la

alimentación animal, ya que la fibra detergente ácida tiene correlación negativa con la digestibilidad del material (VanSoest et al., 1991; Sánchez y Soto, 1998).

Esta disminución en el contenido de fibra detergente neutro permite mayor consumo de alimento debido a que se reduce la posibilidad de alcanzar el llenado físico del rumen, lo que aumenta la capacidad para consumir alimento por parte del animal (Oba y Allen, 1999). Al utilizar la ecuación propuesta por Belyea et al., (1996), que relaciona la concentración de fibra detergente neutro con el consumo de materia seca ( $CMS=120/\%FDN$ ), los tratamientos evaluados permitirían a un rumiante consumir entre 2,1 y 3,2% de su peso corporal en materia seca cuando se ofrece el material fresco. No obstante, al realizar la estimación con material ensilado el consumo de materia seca se aumenta 2,5 – 3,8% del peso corporal, esto podría generar un beneficio productivo ya que usualmente los animales que consumen más alimentos pueden producir más.

La fibra detergente ácida fue afectada de manera significativa ( $p<0,05$ ) por las interacciones de segundo grado entre la especie de leguminosa, la fuente de carbohidratos y el ensilaje; tal y como se puede apreciar en el Cuadro 2. Cuando se considera el efecto de la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidrato agregado, se debe tomar en cuenta el contenido de ambas fracciones en los materiales, ya que esto define finalmente la concentración de esta fracción en el ensilado. Las interacciones de la especie de leguminosa y de la fuente de carbohidratos utilizada, incorporan el efecto de la dinámica de los microorganismos del ensilaje, los cuales degradan los azúcares, almidones y los carbohidratos fibrosos disponibles en las mezclas, lo que reduce el contenido de la FDA en las mezclas forrajeras.

Finalmente, los valores de fibra detergente ácido de los tratamientos fueron mayores a los resultados reportados por Contreras-Govea et al., (2009) (18,0 – 21,2 %MS) para mezclas ensiladas de maíz con tres especies diferentes de leguminosas. Este comportamiento de la FDA puede ser debido al aporte que realiza la fuente de carbohidratos a la mezcla, lo que reduce el contenido de FDA en la mezcla forrajera.

La lignina fue afectada también por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidrato y la interacción entre el ensilaje forraje y la fuente de carbohidratos (Cuadro 2). Los efectos de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos dependen, al igual que como se indicó en la fibra detergente ácido, de

la concentración de esta fracción en cada material y a la combinación entre ambos. Las leguminosas leñosas poseen mayor contenido de lignina debido a que son forrajes de mayor edad (Neylon y Kung Jr, 2003; Kuoppala et al., 2009) que las leguminosas herbáceas. Además de acuerdo con de acuerdo a Emaga et al., (2008) y a Mohapatra et al., (2010) las cáscaras de frutos de Musáceas (ABB) como el guineo cuadrado poseen entre 6,1 y 16,0% de lignina, esto provoca que los tratamientos donde se utilizó fruto de guineo cuadrado con las leguminosas herbáceas sean los de mayor concentración de lignina.

La lignina se correlaciona de manera negativa con la degradabilidad de la materia seca y con menor concentración de ácidos grasos volátiles en el rumen, aunque se ha determinado que más que la presencia de la lignina, es el ordenamiento de la matriz de la pared, donde se encuentra la lignina, la que define la dificultad para degradar los polisacáridos de la pared celular (Ramírez et al., 2002).

Los niveles de lignina de los tratamientos elaborados con leguminosas herbáceas son mayores a los resultados publicados por Castillo et al., (2009) (2,60 – 4,60 %MS) con ensilados de maíz-vigna, debido a la reducción que hace el maíz en la mezcla forrajera. Todos los tratamientos elaborados con leguminosas arbustivas son similares a los resultados reportados por Richards et al., (1994) (8,76 y 10,67 %MS) para ensilajes de *Leucaena leucocephala* y *Gliricidia sepium*, respectivamente, estas similitudes se originan en el hábito de crecimiento de estas leguminosas, ya que son arbustivas, con mayores concentraciones de lignina, comparados con leguminosas herbáceas.

Los carbohidratos no fibrosos fueron afectados por la interacción entre el ensilaje y la especie de leguminosa, también fue influenciado por la interacción entre la fuente de carbohidratos utilizada y el ensilaje (Cuadro 2). En lo que respecta al efecto del ensilaje, el aumento en la concentración de los carbohidratos no fibrosos de los forrajes ensilados con respecto a los forrajes frescos, se debe a un efecto de cálculo. Los carbohidratos no fibrosos se estiman a partir de la ecuación  $CNF=100-(PC+CEN+EE+FDN_{PC})$ , por lo tanto, al cambiar la concentración de los componentes de la ecuación, se cambia la concentración de los carbohidratos no fibrosos. En esta investigación los carbohidratos no fibrosos aumentan al pasar de material fresco a ensilado, por la reducción que hubo en el contenido de FDN.

La concentración de los carbohidratos no fibrosos en la mezcla depende de la cantidad de CNF en el forraje utilizado, donde plantas con mayor edad presentarán concentraciones menores (Kouppala et al., 2009), además la fuente de carbohidratos afecta la concentración en la mezcla debido a la diferencia en el contenido de esta porción en cada materia prima utilizada.

Claramente se debe detallar más con un análisis que permitan diferenciar los carbohidratos presentes en las mezclas, ya que, muchos de estos pueden estar en forma de almidones y no participar del proceso de ensilaje, lo que permite procesos fermentativos inapropiados y aumenta las pérdidas de calidad nutricional del material y pérdidas en calidad propias del material, sobre todo características organolépticas.

#### *4.5.3. Contenido energético de las mezclas*

El contenido energético de las mezclas antes y después del ensilaje, fue afectado por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos, también fue influenciado por la interacción entre la especie de leguminosa y el ensilaje. Además, se ve afectado por la interacción entre la fuente de carbohidratos agregado a la mezcla y el ensilaje (Cuadro 3).

De esta manera, la composición energética de cada aditivo y cada forraje afecta la constitución energética de las mezclas ensiladas. La adición de carbohidratos permite mayor aporte energético para el animal. Sin embargo, si se suma el factor de la especie de leguminosa, entonces se debe considerar el contenido de fibra también, ya que especies leñosas como la *Cratylia* y el *Erythrina* presentan mayor contenido de fibra detergente ácida comparado con especies herbáceas como el *Arachis* y la *Vigna*. A pesar de lo anterior, la cantidad de material digestible aumenta producto del ensilaje, debido a la menor cantidad de celulosa y hemicelulosa en las mezclas ensiladas (Cuadro 2). Todos estos efectos influyen en el contenido energético final de las mezclas ensiladas.

Cuadro 3. Contenido energético en forma de total de nutrimentos digestibles (TND), energía neta de lactancia 1x (EN<sub>L</sub>) y energía neta de lactancia 3x (EN<sub>L3x</sub>) de las mezclas de leguminosas con diferentes tipos de carbohidratos, en fresco y con 50 días de fermentación San José, Costa Rica. 2016.

Forraje	Leguminosa	CHO*	TND** (%)	EN <sub>L</sub> ** (Mcal/kg MS)	EN <sub>L3x</sub> ** (Mcal/kg MS)
Fresco	Vigna	Melaza	62,21	1,40	1,36
		PCD	60,67	1,37	1,34
		Maíz	62,70	1,42	1,37
		Guineo	61,02	1,37	1,34
	Arachis	Melaza	62,92	1,42	1,38
		PCD	61,81	1,39	1,36
		Maíz	62,61	1,41	1,37
		Guineo	61,27	1,38	1,35
	Cratylia	Melaza	60,92	1,37	1,34
		PCD	60,72	1,37	1,34
		Maíz	60,28	1,36	1,33
		Guineo	59,69	1,34	1,32
	Erythina	Melaza	60,31	1,36	1,33
		PCD	60,98	1,37	1,34
		Maíz	59,55	1,34	1,32
		Guineo	59,86	1,35	1,33
Ensilado	Vigna	Melaza	62,96	1,42	1,38
		PCD	60,20	1,36	1,33
		Maíz	62,40	1,41	1,37
		Guineo	59,22	1,33	1,31
	Arachis	Melaza	63,05	1,42	1,38
		PCD	62,53	1,41	1,37
		Maíz	64,03	1,45	1,39
		Guineo	61,36	1,38	1,35
	Cratylia	Melaza	61,29	1,38	1,35
		PCD	60,62	1,37	1,34
		Maíz	61,82	1,39	1,36
		Guineo	61,18	1,38	1,35
	Erythina	Melaza	61,54	1,39	1,35
		PCD	60,76	1,37	1,34
		Maíz	61,16	1,38	1,35
		Guineo	59,72	1,34	1,32
	Leguminosa		<0,0001	<0,0001	<0,0001
	CHO		<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Forraje		0,0401	0,0401	0,0403
	L*C		0,0111	0,0111	0,0111
	L*F		0,0467	0,0467	0,0464
	F*C		0,0387	0,0387	0,0386
	F*L*C		-	-	-
	E.E.***		0,99	0,04	0,03

\*Fuentes de carbohidratos

\*\*Total de nutrimentos digestibles (TND), energía neta de lactancia 1x (EN<sub>L</sub>), energía neta de lactancia 3x (EN<sub>L3x</sub>)

\*\*\*Error estándar

Los valores de energía de las mezclas ensiladas son menores al valor obtenido por Castillo et al., (2009) (63,87 %TND y 1,45 Mcal EN<sub>L</sub>/kg de materia seca) con ensilados de mezclas de maíz-vigna y a los resultados publicados por Tobía et al., (2004) (1,39 Mcal EN<sub>L3x</sub>/kg de materia seca) para ensilados de soya, pero comparables a los resultados de ensilados de maíz publicados por este mismo autor (1,32 Mcal EN<sub>L3x</sub>/kg de materia seca). Todos los materiales ensilados presentaron valores mayores de energía con respecto a los trabajos de Cubero et al., (2010) (57,65 %TND) con ensilados de maíz donde se utilizó inóculo microbial, aunque similares a los reportados por Betancourt (2004). Las diferencias se deben a la cantidad de energía presente en forrajes como el maíz y la soya, lo que aumenta el contenido energético de los ensilados. Sin embargo, también existen ensilados que han tenido un mal proceso de conservación y han perdido parte de su calidad nutricional, lo que ha provocado que ensilados de maíz tengan valores menores o similares a los de esta investigación.

En la Figura 2 es posible apreciar que, conforme aumenta el consumo de ensilado aumenta la cantidad de leche producida, esto es esperable debido a que hay mayor aporte de nutrimentos para aumentar la producción de leche. También se puede observar que al igual que en la Figura 1, las mezclas ensiladas elaboradas con leguminosas leñosas permiten obtener una producción de leche similar que los ensilados de maíz, pero menor que los ensilados de soya forrajera publicados en el trabajo de Tobía et al., (2004). Cuando se utiliza el requerimiento de energía neta de lactancia para producir un kilogramo de leche y al calcular el aporte de energía de los ensilados, se puede estimar que en el mayor nivel de consumo (15 kg MV/vaca/día) las mezclas evaluadas tienen el potencial para producir entre 2,8 y 6,1 kg leche/vaca/día. Mientras que cuando se utiliza en el menor nivel de consumo (5 kg MV/vaca/día) su potencial se reduce a no más de 2,0 kg leche/vaca/día.

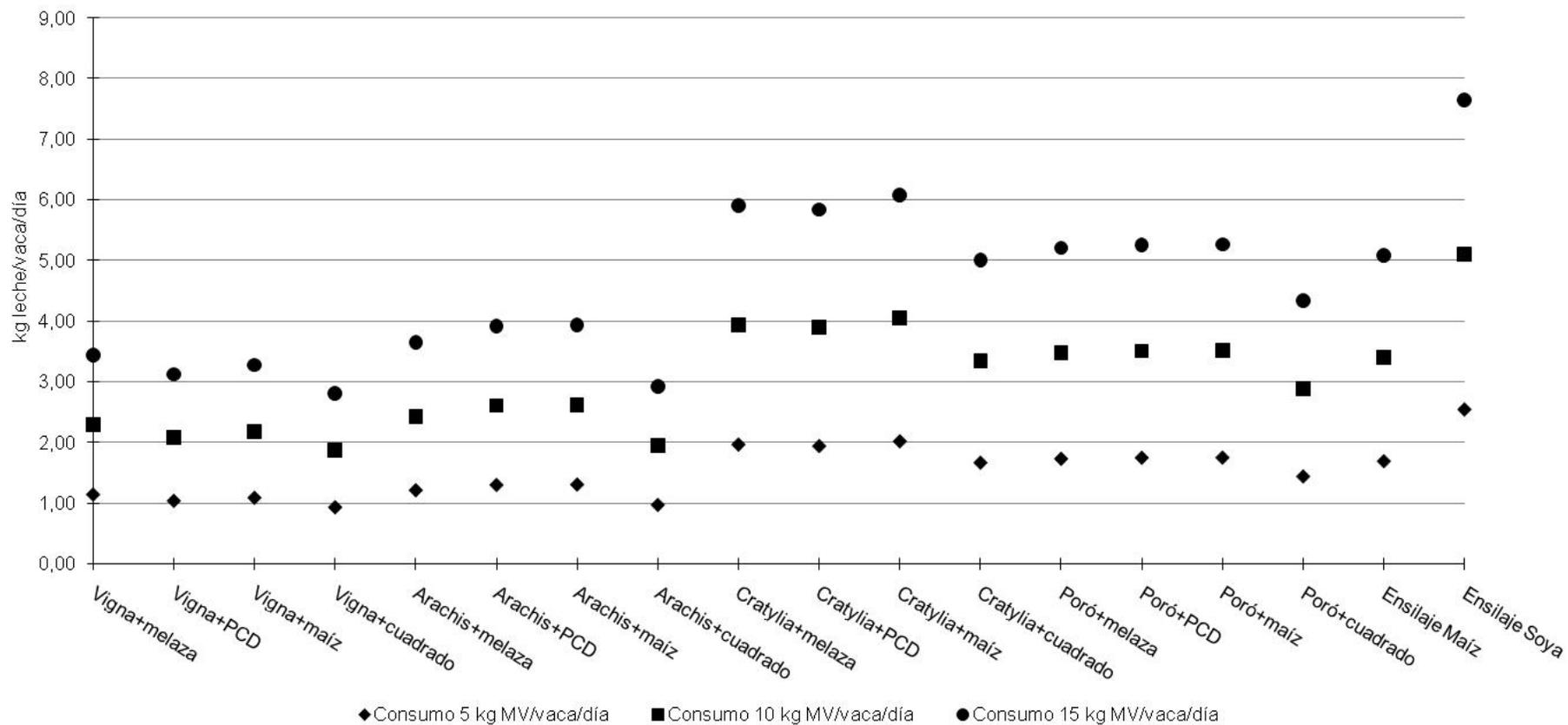


Figura 2. Potencial productivo (por requerimiento de energía neta de lactancia 3x) en kg de leche/vaca/día de los tratamientos evaluados, comparado con ensilados de maíz y soya, de acuerdo al nivel de consumo de Materia verde (MV) (5, 10 y 15 kg MV/día). San José, Costa Rica 2016

#### 4.6. CONCLUSIONES

Las leguminosas arbustivas presentaron mayor contenido de materia seca, FDN y FDA que las leguminosas herbáceas, debido a un efecto de edad del forraje; aunque no se detectaron diferencias entre *Arachis* y *Vigna*, ni entre *Erythrina* y *Cratylia*. Por otra parte, no se determinaron diferencias en el contenido de proteína cruda entre leguminosas arbustivas y herbáceas, pero las herbáceas presentaron más TND que las arbustivas debido a menor lignificación de los tejidos en las plantas herbáceas.

También se determinó que el ensilaje puede cambiar la calidad nutricional de los forrajes, estos cambios son provocados por la actividad de los microorganismos durante el ensilaje. De esta manera, la hemicelulosa se reduce 32,0% y la celulosa 14,1%, al pasar de fresco a ensilado; la disminución de estos componentes de la fibra provocan dos efectos importantes, el primero una mayor capacidad de consumo por parte del animal debido a la disminución de la FDN y el segundo un incremento en la digestibilidad de material, por reducción en la concentración de FDA. El valor de lignina no cambió con el ensilaje.

La materia seca de los ensilados se redujo al pasar de fresco a ensilado debido a que la técnica de microsilos no permite la salida de los efluentes, lo que acumula agua en el ensilado final. Por otra parte, la concentración de proteína cruda se redujo 3,6% debido a pérdidas en forma de nitrógeno amoniacal. La disminución en el contenido de fibra y proteína cruda afecta el cálculo de los CNF en los ensilados, por lo tanto esta fracción aumenta 29,5% cuando se pasa de fresco a ensilado.

Se estimó que los materiales ensilados permiten una producción diaria de 1,3 kg leche/vaca al consumir 5 kg Material verde (MV)/animal/día y, 4,0 kg leche /vaca al consumir 15 kg MV/animal/día, por lo que se consideran forrajes de buena calidad para la alimentación de rumiantes, pero como complemento dentro de una dieta balanceada.

#### 4.7. LITERATURA CITADA

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD
- Belyea, R., B. Steevens, G. Garner, J. Whittier y H. Sewell 1996. Using NDF and ADF to balance diets. University of Missouri Extension Leaflet G3161. University of Missouri Extension, Columbia MO.
- Bernal L., Ávila P., Ramírez G., Lascano C.E., Tiemann T., Hess H. 2011. Efecto del ensilaje y el heno de *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* sobre la producción de gas in vitro. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 16(3): 97 – 103.
- Berndt S.A. 2002. Composición nutricional y calidad de ensilajes de la zona sur. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 126 pp.
- Betancourt J.C. 2004. Caracterización nutricional y productiva de material fresco y ensilado de maní forrajero (*Arachis pintoi*) cultivado en asocio con maíz (*Zea mays*), a tres densidades de siembra. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 110 p.
- Camero A., Franco M. 2001. Improving rumen fermentation and milk production with legume-tree fodder in the tropics. *Agroforestry Systems* 51(2): 157-166.
- Castillo M., Rojas A., WingChing R. 2009. Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna (*vigna radiata*). *Agronomía Costarricense* 33(1): 133-146.
- Church D.C., Pond W.G., Pond K.R. 2003. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. LIMUSA WILEY. México D.F. 636 p
- Colombatto D., Mould F.L., Bhat M.K., Phipps R.H., Owen E. 2004. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Animal Feed Science and Technology* 111(1): 111 – 128.
- Contreras-Govea, F.E., Muck R.E., Armstrong K.L., Albrecht K.A. 2009. Nutritive value of corn silage in mixture with climbing beans. *Animal of feed Science and Technology* 150:1-8.
- Cubero, J.F., A. Rojas-Bourrillón y R. WingChing 2010. Uso del inóculo microbial elaborado en finca en ensilaje de maíz (*Zea mays*). Valor nutricional y fermentativo. *Agronomía Costarricense*. 34(2): 237-250.
- Davies D.R., Merry R.J., Williams A.P., Bakewell E.L., Leemans D.K., Tweed J.K.S. 1998. Proteolysis During Ensilage of Forages Varying in Soluble Sugar Content. *Journal of Dairy Science* 81(2): 444-453.

- Devendra C., Pezo D. 2001. Crop-animal systems in Asia and Latin America: Characteristics, opportunities for productivity enhancement and emerging challenges, including comparisons with West Africa. In: Proceedings of an international conference on 'Sustainable crop-livestock production for improved livelihoods and natural resource management in West Africa. 19-22.
- Di Rienzo J A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo Y.C. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Drucker D.B. 1970. Analysis of lactic acid and volatile fatty acids extracted from bacterial fermentations. *Journal of Chromatographic Science* 8(8): 489 – 490.
- Elferink O., Driehuis F., Gottschal J. C., Spoelstra S.F. 2005. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Institute for Animal Science and Health. Holanda. 1-14 pp.
- Emaga, T.H., C. Robert, S.N. Ronkart, B. Wathelet, M. Paquot. 2008. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresour. Tech.* 99(10): 4346 – 4354.
- Eun J.S., Beauchemin K.A., Schulze H. 2007. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. *Journal of Dairy Science* 90(3): 1440 – 1451.
- Flores O.I., Bolivar D.M., Botero J.A., Ibrahim, M.A. 1998. Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial forrajero para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, 10(1): 1-10.
- Fussell R.J., McCalley D.V. 1987. Determination of volatile fatty acids (C 2—C 5) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst* 112(9): 1213 – 1216.
- Garcia G.W., Ferguson T.U., Neckles F.A., Archibald K.A.E. 1996. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology* 60(1): 29 – 41.
- Heinritz S.N., Martens S.D., Avila P., Hoedtke S. 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal feed science and technology* 174(3): 201 – 210.
- Hiriart M. 2008. Ensilados. Procesamiento y Calidad. Editorial Trillas. 2da edición. México. 110p.
- Holmann F., Lascano C. 2001. Sistemas de alimentación con leguminosas para intensificar fincas lecheras. Consorcio Tropic leche. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Documento de Trabajo No. 184. Cali, Colombia. 109p.

- Kung L., Shaver R. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on forage*: 3(13): 1 – 5.
- Kuoppala K., Ahvenjärvi S., Rinne M., Vanhatalo A. 2009. Effects of feeding grass or red clover silage cut at two maturity stages in dairy cows. 2. Dry matter intake and cell wall digestion kinetics. *Journal of Dairy Science* 92(11): 5634 – 5644.
- López-Herrera-Herrera, M., R. WingChing y A. Rojas-Bourrillón. 2009. Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas comosus*). *Agronomía Costarricense*. 33(1): 1 – 15.
- McDonald P. 1981. *The Biochemistry of Silage*. John Wiley & Sons. Ltd. New York. 226 p.
- Mohapatra D., S. Mishra, y N. Sutar. 2010. Banana and its by-product utilization: an overview. *J. Sci. Ind. Res.* 69(5). 323 – 329.
- Mustafa A.F., Seguin P. 2003. Characteristics and in situ degradability of whole crop faba bean, pea, and soybean silages. *Canadian Journal of Animal Science* 83(4): 793 – 799.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. National Academy Press. Washington DC. 408 p.
- Neylon J.M., Kung L. 2003. Effects of cutting height and maturity on the nutritive value of corn silage for lactating cows. *Journal of Dairy Science* 86(6): 2163 – 2169.
- Oba M., Allen M.S. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82(3): 589 – 596.
- Pezo D, Ibrahim M. 1998. *Sistemas silvopastoriles*. Colección de Modelos de Enseñanza Agroforestal No. 2. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Ramírez, R., R.G. Ramírez y F. López. 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL* 2: 180 – 189.
- Richards D.E., Brown W.F., Rueggsegger G., Bates D.B. 1994. Replacement value of tree legumes for concentrates in forage-based diets. I. Replacement value of *Gliricidia sepium* for growing goats. *Animal Feed Science and Technology* 46(1): 37 – 51.
- Sánchez, J. M., H. Soto 1998. Estimación de la calidad nutricional de los forrajes del cantón de San Carlos. II. Componentes de la pared celular. *Nutr. Anim. Trop.* 4(1):7-19.
- Tobía C., Rojas A., Villalobos E., Soto H., Uribe L. 2004. Sustitución parcial el alimento balanceado por ensilaje de soya y su efecto en la producción y calidad de la leche

- de vaca, en el trópico húmedo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(2):27-35.
- Van Soest P.J., Robertson, J.B. 1985. Analysis of forages and fibrous food. AS 613. Cornell University, A Laboratory Manual. Department of Animal Science. Ithaca NY. 613 p.
- Van Soest, P.V., Robertson, J.B. y Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74(10): 3583-3597.
- Vargas R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37pp.
- Weiss W.P. 2004. Fine-tuning energy calculations. Proceedings Tri-State Dairy Nutrition Conference. Purdue University, Michigan State University, Ohio State University, United States. 170 p
- WingChing-Jones R., Rojas-Bourrillón A. 2005. Composición nutricional y características fermentativas del ensilaje de maní forrajero. *Agronomía Costarricense* 30(1):87 – 100.

## **CAPITULO 5.**

### **EFFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS SOBRE EL FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA EN MEZCLAS PARA ENSILAJE.**

## CAPITULO 5. EFECTO DE LA ESPECIE DE LEGUMINOSA Y LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS SOBRE EL FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA EN MEZCLAS PARA ENSILAJE.

### 5.1. RESUMEN

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos sobre el fraccionamiento de la proteína de mezclas ensiladas elaboradas a partir de las leguminosas, *Arachis pintoii*, *Vigna unguiculata*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana*, con 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, grano de maíz molido y fruto inmaduro de guineo cuadrado). El experimento se desarrolló entre 2015 y 2016, este consta de un arreglo factorial 4x4 de 16 tratamientos, con 4 repeticiones por tratamiento. La parte experimental se desarrolló en Montes de Oca, Costa Rica y los forrajes fueron cosechados en Upala, Costa Rica. Las mezclas se almacenaron durante 50 días en silos de bolsa con capacidad para 5 kg. La interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidrato fue significativa ( $p < 0,05$ ) para la fracción A, mientras que para las fracciones B2, B3 y C de la proteína, el efecto principal de la especie de leguminosa fue el que generó diferencias ( $p < 0,05$ ). No se detectaron diferencias entre las leguminosas arbustivas y las herbáceas, ni entre las fuentes de carbohidratos. La fracción B1 no fue afectada por ningún componente de la mezcla ( $p > 0,05$ ), mientras que la fracción C aumentó cuando se utilizó fruto de guineo cuadrado. Los ensilados evaluados presentaron concentraciones de PDR entre 30,6 y 60,4% PC y de PnDR entre 26,5 y 55,9% PC, donde la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos fue la principal fuente de diferencias ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. De los valores obtenidos de PDR, 30,5 – 44,7% PC pertenecen a nitrógeno no proteico (NNP) o fracción A, mientras que de los datos determinados para PnDR, 9,9 – 24,0% PC pertenece a la fracción C. Se concluye que los ensilados evaluados poseen alto contenido de PDR, lo que permite estimular la producción de proteína microbiana en el rumen. Además, poseen adecuada concentración de PnDR que puede ser absorbida en el intestino delgado, llenar los requerimientos de nutrimentos de animales de alta producción y, mejorar el contenido de proteína en leche.

**Palabras clave:** Conservación de Forrajes, Ensilajes de leguminosas, Aditivos, Calidad de ensilajes

## 5.2. ABSTRACT

**Effect of legume species and source of carbohydrates on the protein fractionation of silage mixtures.** The objective of this experiment was to determine the effect of legume species and carbohydrate source on the protein fractionation of ensiled mixtures made with legumes *Arachis pintoi*, *Vigna unguiculata*, *Cratylia argentea* and *Erythrina poeppigiana*, with 4 sources of carbohydrates (sugar cane molasses, dehydrated citrus pulp, ground corn kernel, and immature saba banana fruit). The experiment was developed between 2015 and 2016, with a 4x4 factorial arrangement, 16 treatments and 4 replicates per treatment. The experimental part was developed in Montes de Oca, Costa Rica and forages were harvested in Upala, Costa Rica. The blends were stored for 50 days in bag silos with a capacity of 5 kg. The interaction between legume species and carbohydrate source was significant ( $p < 0.05$ ) for fraction A, whereas for fractions B2, B3 and C of the crude protein, the main effect was the legume species which generated differences ( $p < 0.05$ ). No differences were found between shrub and herbaceous legumes, nor among carbohydrate sources. The fraction B1 was not affected by any component of the mixture ( $p > 0.05$ ), while fraction C increased when saba banana fruit was used. The evaluated silages had concentrations of RDP between 30.6 and 60.4% CP, and RUP between 26.5 and 55.9% CP, where the interaction between the legume species and the carbohydrate source was the main source of differences ( $p < 0.05$ ) between treatments. From the values obtained from RDP 30.5 - 44.7% CP belong to non-protein nitrogen (NPN) or fraction A, while from the data determined for RUP 9.9 - 24.0% PC belongs to the fraction C. It is concluded that evaluated silages possess a high content of RDP, which stimulate microbial protein production in the rumen, also possess an adequate concentration of RUP that can be absorbed in the small intestine, to satisfy the nutrient requirements of high performance animals and improve protein content in milk.

**Keywords:** Forage conservation, Legumes silage, Additives, Quality silage

### 5.3. INTRODUCCIÓN

El Modelo Cornell Net Carbohydrate Protein System (CNCPS) considera que la proteína cruda está dividida en 5 fracciones, definidas como: A, B1, B2, B3 y C; de acuerdo a su posibilidad de ser degradada en el ambiente del rumen o a la posibilidad de superar la degradación del rumen y ser aprovechada en el intestino (Sniffen et al. 1992),, inclusive considera la fracción de la proteína que no puede ser aprovechada y es excretada por el animal (Licitra et al.,1996).

Realizar estas determinaciones es necesario cuando se quiere maximizar el uso de los nutrimentos en la dieta y la producción de proteína microbiana en el rumen (Guo et al., 2008), además reducir las pérdidas de nitrógeno que generan impacto sobre el ambiente y pérdidas económicas, al no aprovechar de manera eficiente los nutrimentos (Lanzas et al., 2007). Finalmente, el determinar las diferentes fracciones de la proteína cruda permite conocer la cantidad de nitrógeno que logra sobrepasar el rumen, fracción que puede satisfacer los requerimientos de animales de alto rendimiento productivo (leche o carne) (Givens y Rulquin, 2004).

En los sistemas de producción tropicales de los países en desarrollo es común el uso de forrajes arbustivos leguminosos y no leguminosos para aumentar la cantidad de nutrimentos en las dietas de rumiantes (Steinfeld et al., 2006; McDermott et al., 2010). Esto se ha extendido como estrategia para reducir el uso de alimentos balanceados de alto costo (Tobía et al. 2004), ya sea mediante el uso de bancos forrajeros (Pezo e Ibrahim 1998) o en plantaciones para cosechar y conservar mediante el ensilaje (Tobía et al. 2004; Castillo et al. 2009). Por su parte Singh et al., (2012) indican que los forrajes verdes tienen la capacidad de proveer los nutrimentos requeridos por los animales de producción.

El contenido de proteína cruda de las leguminosas puede oscilar entre 18,0 y 30,0 % MS, que sobrepasa el requerimiento de los animales (Dewhurst et al., 2009). Sin embargo, cuando se realizan ensilajes de leguminosas se obtienen altas concentraciones de nitrógeno degradable en el rumen, esto conlleva a ineficiente utilización del forraje y aumento en la excreción de nitrógeno por la orina (Cohen et al. 2006). Además, de acuerdo a Dewhurst et al., (2009) ensilajes de trébol rojo (*Trifolium pratense*) poseen concentraciones de 30 – 40% de la proteína cruda en forma de

nitrógeno no proteico (NNP) y entre 28 – 40% de proteína no degradable en el rumen (PnDR).

De esta manera, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la especie de leguminosa forrajera y la fuente de carbohidratos, en el fraccionamiento de la proteína cruda en mezclas ensiladas.

## 5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.4.1. Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Campus Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca, donde se encuentran los laboratorios del Centro de Investigaciones en Nutrición Animal (CINA) para realizar los análisis de laboratorio. Los forrajes utilizados en esta investigación fueron obtenidos en la finca Agroecológica Vocaré ubicada en el cantón de Upala a 120 - 180 msnm, con una precipitación promedio de 2500 mm anuales y una temperatura promedio de 25 °C.

### 5.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas

Los forrajes y edades de cosecha utilizados fueron: *Vigna unguiculata* (40 días), *Arachis pintoi* (40 días), *Cratylia argentea* (75 días) y *Erythrina poeppigiana* (75 días). Las edades de corte de las leguminosas se fijaron de acuerdo al hábito de crecimiento de forraje (de piso o de corte) y edad, de manera que no sean forrajes muy maduros con alto contenido de fibra y lignina. Las especies arbustivas fueron cosechadas a 1,20m de altura, mientras que las leguminosas herbáceas fueron cosechadas al nive de suelo.

Los niveles de inclusión y las fuentes de carbohidratos utilizadas fueron: melaza de caña de azúcar (6,3% p/p), pulpa de cítricos deshidratada (8,4% p/p), maíz molido (6,4% p/p) y fruto inmaduro de guineo cuadrado (6,7% p/p) de manera que provean 5% del total de carbohidratos no fibrosos de la mezcla. El 5% restante para alcanzar el 10% de carbohidratos no fibrosos, fue provisto por las leguminosas. El fruto inmaduro de guineo cuadrado se encontraba en estado inmaduro y completamente engrosado al momento de la cosecha.

#### 5.4.3. *Diseño experimental y tratamientos*

El experimento se formuló con un diseño factorial completamente aleatorizado (4x4), con 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido y fruto de guineo cuadrado) y 4 especies leguminosas (*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoii*, *Cratylia argéntea* y *Erythrina poeppigiana*). Todos los tratamientos se uniformizaron para contener 10 % de carbohidratos no fibrosos para asegurar una adecuada fermentación (Vargas, 1979; Hiriart, 2008). A todos los tratamientos se les agregó inóculo bacteriano artesanal (elaborado por fermentación anaeróbica durante 30 días, a partir de suero de leche, leche y melaza – *Lactobacillus* 1,0 x 10<sup>9</sup> UFC/mL) (1L/tonelada) con base en el peso en fresco.

La conservación de los tratamientos se realizó por medio de la técnica de microsilos. Cada tratamiento fue repetido 4 veces para un total de 64 microsilos. Además, cada bolsa se consideró como una unidad experimental.

#### 5.4.4. *Procedimiento experimental*

El ensilaje de las mezclas forrajeras se realizó mediante la técnica de microsilos de bolsa, para este fin se utilizó bolsas de polietileno para empaque al vacío con capacidad para 5 kg y grosor de 0,0063 mm. Cada bolsa se llenó con 4 kg de mezcla para ensilar. El material una vez depositado y compactado a mano, se extrajo el aire a fondo mediante aspiradora. Posterior a la eliminación del oxígeno, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se transportaron con vehículo a las instalaciones de la Universidad de Costa Rica, ahí se colocaron en condiciones de laboratorio (25°C, 75% humedad relativa, aproximadamente), donde estuvieran protegidas del ataque de aves, roedores o labores rutinarias que podrían perjudicar el proceso de ensilaje.

#### 5.4.5. *VARIABLES A EVALUAR*

Cuando los materiales tuvieron 50 días de fermentación se realizó la apertura de los silos y se envió el contenido de la bolsa al laboratorio de bromatología de forrajes para determinar: el contenido de proteína cruda (PC) por medio de la metodología descrita en el manual de la AOAC (1998), mientras que el fraccionamiento de la proteína (A, B1, B2, B3 y C) se realizó por medio de la metodología descrita por Licitra et al. (1996). Se calculó la proteína degradable en el

rumen (PDR) y la proteína no degradable en el rumen (PnDR) de la siguiente manera:  $PDR=A+B1$  y la  $PnDR=B2+B3+C$ .

#### 5.4.6. Análisis de la información

El análisis de la información se realizó con un Modelo ANOVA de INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2016) considerando como efectos principales: la fuente de carbohidratos (C), la especie de leguminosa (L) y la interacción de las fuentes principales (L\*C). Para la comparación entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

### 5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.5.1. Nitrógeno no proteico (Fracción A)

Esta fracción está constituida principalmente por:  $NH_3$ ,  $NO_3$ , junto con aminoácidos y péptidos libres. Estas moléculas son degradadas de manera inmediata cuando ingresan al rumen, por lo que no hay nada que pase al intestino delgado (Chalupa y Sniffen, 1996). Así, la concentración de esta fracción de la proteína cruda fue afectado de manera significativa ( $p<0,05$ ) por la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidrato adicionado (Cuadro 1).

En esta investigación, la fracción A se mantuvo entre 3,9 y 8,9% de la materia seca, esto representa entre 28,3 y 56,9% de la proteína cruda total en cada tratamiento (Cuadro 1). Al compararlos con los reportados por Guo et al., (2008) (43,4 – 68,4% PC), se puede observar que los tratamientos evaluados presentan mucha variación que puede estar determinada por la especie de leguminosa, la capacidad amortiguadora del forraje, y la calidad del ensilaje.

De acuerdo a Grabber (2009) la fracción A puede variar hasta 59% en materiales ensilados debido a procesos de proteólisis que ocurren en el ensilaje, además debido a esto, los valores de la fracción A son mayores en materiales ensilados que en materiales frescos. Además, Slottner y Bertilsson (2006) señalan que durante el ensilaje ocurren proceso de proteólisis que dependen de varios factores como temperatura, pH, compuestos inhibidores y el contenido de materia seca del forraje. De esta manera, un mal ensilado permiten la degradación de las proteínas en

amonio, esto provoca un aumento del nitrógeno amoniacal en el silo, lo que en consecuencia aumenta la cantidad de fracción A del ensilado.

Cuadro 1. Contenido de proteína cruda (PC) y fraccionamiento de la proteína cruda en las mezclas de leguminosas con diferentes fuentes de carbohidratos, a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	PC <sup>1</sup> (% MS)	Fracciones de la proteína				
			A** (%PC)	B1**(% PC)	B2**(% PC)	B3**(% PC)	C**(% PC)
Vigna	Melaza	15,5	8,9 <sup>a</sup> (56,9)	0,55(3,5)	2,4 <sup>a</sup> (16,2)	1,5 <sup>d</sup> (10,2)	2,0 <sup>b</sup> (13,2)
	PCD	14,8	6,8 <sup>abc</sup> (46,4)	0,34(2,3)	3,1 <sup>a</sup> (21,1)	2,3 <sup>cd</sup> (15,8)	2,1 <sup>b</sup> (14,5)
	Maíz	15,9	7,6 <sup>ab</sup> (47,3)	0,30(1,8)	3,9 <sup>b</sup> (24,9)	2,6 <sup>cd</sup> (16,0)	1,6 <sup>a</sup> (9,9)
	Guineo	13,9	3,9 <sup>c</sup> (28,3)	0,30(2,3)	4,6 <sup>b</sup> (33,1)	2,7 <sup>cd</sup> (19,1)	2,4 <sup>b</sup> (17,2)
Arachis	Melaza	19,4	5,8 <sup>abc</sup> (29,9)	0,45(2,2)	4,7 <sup>b</sup> (24,6)	5,9 <sup>ab</sup> (30,6)	2,5 <sup>b</sup> (12,8)
	PCD	17,4	6,2 <sup>abc</sup> (35,4)	0,23(1,4)	4,5 <sup>b</sup> (26,0)	4,1 <sup>bc</sup> (23,2)	2,5 <sup>b</sup> (14,1)
	Maíz	17,9	5,2 <sup>bc</sup> (28,9)	0,38(2,1)	4,7 <sup>b</sup> (26,0)	5,4 <sup>ab</sup> (29,9)	2,3 <sup>b</sup> (13,0)
	Guineo	17,8	4,9 <sup>bc</sup> (28,1)	0,81(4,5)	4,2 <sup>b</sup> (23,4)	4,6 <sup>ab</sup> (25,8)	3,3 <sup>c</sup> (18,2)
Cratylia	Melaza	15,8	6,9 <sup>abc</sup> (43,9)	0,13(0,8)	2,6 <sup>a</sup> (16,6)	3,7 <sup>bc</sup> (23,3)	2,4 <sup>b</sup> (15,5)
	PCD	16,5	6,1 <sup>abc</sup> (36,9)	0,38(2,3)	3,2 <sup>a</sup> (19,9)	3,6 <sup>bc</sup> (21,8)	3,2 <sup>c</sup> (19,6)
	Maíz	16,1	6,6 <sup>abc</sup> (41,2)	0,98(6,1)	2,8 <sup>a</sup> (17,4)	2,6 <sup>cd</sup> (15,8)	3,1 <sup>c</sup> (19,4)
	Guineo	16,5	7,8 <sup>ab</sup> (47,6)	0,48(2,8)	2,7 <sup>a</sup> (16,6)	2,2 <sup>cd</sup> (13,5)	3,2 <sup>c</sup> (19,6)
Erythrina	Melaza	16,7	5,8 <sup>abc</sup> (34,8)	0,28(1,6)	4,5 <sup>b</sup> (26,8)	2,5 <sup>cd</sup> (14,9)	3,7 <sup>c</sup> (21,9)
	PCD	16,1	5,9 <sup>abc</sup> (36,8)	0,27(1,7)	3,9 <sup>b</sup> (24,6)	2,3 <sup>cd</sup> (14,2)	3,7 <sup>c</sup> (22,7)
	Maíz	15,2	5,9 <sup>abc</sup> (39,3)	0,44(2,9)	4,3 <sup>b</sup> (28,1)	1,6 <sup>d</sup> (10,9)	2,9 <sup>c</sup> (18,8)
	Guineo	15,4	5,3 <sup>bc</sup> (34,3)	0,31(2,0)	3,8 <sup>b</sup> (24,1)	2,3 <sup>cd</sup> (14,7)	3,7 <sup>c</sup> (24,0)
Valor de p							
Leguminosa (L)			0,0095	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CHO (C)			-	-	-	-	0,0020
LxC			0,0123	-	-	-	-
E.E. ***			0,69 (3,97)	0,26 (1,63)	0,44 (2,64)	0,36 (1,80)	0,23 (1,34)

<sup>1</sup> Proteína cruda

\* Fuente de carbohidratos

\*\* Como % de la materia seca

\*\*\* Error estándar

Letras distintas en la misma columna son diferentes (p<0,05)

Los valores de fracción A obtenidos en esta investigación para mezclas con *Arachis pintoj*, son similares a los obtenidos por WingChing y Rojas, (2007) con ensilados de *Arachis pintoj*. Además, todos los tratamientos evaluados tuvieron contenidos mayores de fracción A comparados a los datos publicados por Betancourt de Flores et al., (2002) en ensilajes de *Leucaena leucocephala*. Sin embargo, todas las mezclas ensiladas presentaron menor cantidad de fracción A con respecto al trabajo de Miquilena et al., (1995) con follaje de *Gliricidia sepium*. Estas variaciones entre trabajos pueden ser explicadas por diferencias en las especies forrajeras utilizadas, capacidad amortiguadora de los forrajes, concentración de carbohidratos solubles antes del ensilaje y contenido de humedad de los forrajes, los cuales afectan la calidad del ensilaje y pueden afectar la concentración de esta fracción.

#### 5.5.2. Fracciones de proteína verdadera (Fracciones B1, B2 y B3)

##### 5.5.2.1. Fracción B1.

En esta investigación los valores oscilaron entre 0,13 y 0,44% de la materia seca, lo que representa 0,13 – 6,11% de la proteína cruda (Cuadro 1). De acuerdo al análisis estadístico, ni la especie de leguminosa, ni la fuente de carbohidratos generan diferencias significativas entre los tratamientos. Acorde a Chalupa y Sniffen, (1996) esta fracción está compuesta por globulinas y algunas albúminas, las cuales son degradables en el rumen (200 – 300%/h), aunque hay una parte de la proteína que sobrepasa la fermentación ruminal y es absorbida en el intestino delgado (100%).

Los valores conseguidos en esta investigación son bajos al compararlos con los datos obtenidos en otras investigaciones (Betancourt de Flores, 1996) donde esta fracción alcanza el 30% del total de proteína cruda. Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente, cuando ocurren procesos de ensilaje deficientes puede ocurrir degradación de las proteínas en aminos y nitrógeno amoniacal (McDonald, 1981; Grabber, 2009). Además, la severidad de la degradación depende del pH y humedad final en el material ensilado, ya que de esto depende la eliminación de las bacterias degradadoras como las Clostridiales (Hiriart, 2008). Esto coincide con lo publicado en la investigación de Guo et al., (2008), quienes detectaron al someter forrajes frescos de alfalfa (*Medicago sativa*) al proceso de ensilaje sin aditivos que se reduce de manera significativa la concentración de la fracción B1 contra el aumento de la fracción A.

Sin embargo, en esta investigación no se puede asegurar que haya ocurrido un proceso de degradación de la proteína de los forrajes, ya que no se cuenta con información de los materiales previo al ensilaje, además de acuerdo a Dewhurst et al., (2009) ensilados de *Trifolium pratense* poseen concentraciones de NNP entre 30 y 40% de la proteína cruda y Fulkenson et al., (2007) obtuvieron concentraciones de NNP promedio de 39,8% de la proteína cruda cuando analizaron forrajes de *Vigna unguiculata* durante el verano.

De acuerdo a Charmley, (2001), este aumento en la proteólisis de la fracción B1, puede conducir a la disminución en el consumo del alimento debido a la alta concentración de nitrógeno amoniacal, para Givens y Rulquin, (2004), esta situación puede agravarse hasta el punto de intoxicar a los animales, especialmente en aquellos cuyas dietas son exclusivas en ensilajes. Por este motivo, es importante tomar las previsiones para reducir la producción de nitrógeno amoniacal en el silo, tal como aumentar el contenido de materia seca (Fransen y Strubi, 1998), aumentar la cantidad de carbohidratos solubles y el uso de bacterias productoras de ácido láctico exógenas (Yitbarek y Tamir, 2014).

Los valores obtenidos en esta investigación fueron menores a los obtenidos por Grabber, (2009) (1,49 – 2,08% MS) con diferentes leguminosas forrajeras de clima templado, aunque mayores a los reportados por Guo et al., (2008) (0,31% MS) con ensilados de alfalfa sin aditivos. Estas diferencias se explican por la especie de leguminosa utilizada, ya que en los trabajos antes mencionados se utilizaron especies leguminosas de clima templado mientras que en esta investigación se utilizaron especies de clima tropical. Las diferencias obtenidas también pueden ser debidas al uso de fuentes de carbohidratos y a la concentración de carbohidratos solubles en los forrajes utilizados, que de alguna manera redujeron el pH en el silo y favorecieron mejor ensilaje que el obtenido en las investigaciones de Guo et al., (2008) y Grabber, (2009).

#### 5.5.2.2. Fracción B2.

Los valores obtenidos de esta fracción oscilaron entre 2,4 y 4,7% de la materia seca, lo que representa 16,2 – 33,1% de la proteína cruda (Cuadro 1 y Figura 1). Además, de acuerdo al análisis estadístico sólo la especie de leguminosa generó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,0001$ ). De esta manera, la especie *Cratylia argentea* fue la que presentó menor concentración de esta fracción (2,8% MS) mientras que el *Arachis pintoi* fue el que presentó el promedio más alto de fracción B2

(4,5% MS). Esta fracción es de gran relevancia para llenar los requerimientos de animales de alto desempeño productivo, ya que los microorganismos del rumen no pueden proveer toda la proteína necesaria para una adecuada cantidad y calidad de leche o carne, por el contrario, se requiere de proteína de sobre paso que provea suficientes aminoácidos para mantener buena productividad (Sampath et al., 2005; Walli, 2005)

Los valores obtenidos en esta investigación son menores a los reportados por Grabber, (2009) (10,68 – 11,22% MS) y Seguin et al., (2002) (12,10 – 13,34% MS) con leguminosas forrajeras de clima templado sin ensilar, es posible que esto se deba a un efecto de especie o a una descomposición de las proteínas de la fracción B2 en amonio durante el proceso de ensilaje, lo que coincide con lo encontrado por Guo et al., (2008).

#### 5.5.2.3. Fracción B3.

El contenido de esta fracción en los ensilados fue afectado de manera significativa por la interacción de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos ( $p < 0,001$ ). La concentración de fracción B3 de los tratamientos evaluados, oscilaron entre 1,6 y 5,9% de la materia seca, lo que representa 10,2 – 30,6% de la proteína cruda total (Cuadro 1 y Figura 1).

Sin embargo, en este caso tanto *Erythrina poeppigiana* y *Vigna unguiculata* presentaron menor concentración de esta fracción (2,2 y 2,3% MS, respectivamente), mientras que el *Arachis pintoi* fue el que mostró el promedio más alto (5,0% MS). Estas diferencias pueden ser debidas al contenido de esta fracción en cada una de las especies utilizadas o si ocurrió daño en las proteínas durante el ensilaje, lo que coincide con lo detectado por Adesogan, (2006) quien señala que si no se aseguran ambientes de calidad para ensilajes, las proteínas se pueden desnaturalizar y bajar su calidad alimenticia.

En cuanto a la fuente de carbohidratos, en promedio los tratamientos elaborados con pulpa de cítricos deshidratada y fruto de guineo cuadrado fueron los que presentaron mayor concentración de esta fracción ( $p < 0,05$ ), esto coincide con lo reportado por López-Herrera et al., (2016), quienes utilizaron pulpa de cítricos deshidratada en la mezcla lo que aumentó el contenido de esta fracción en el ensilado; en el caso del fruto de guineo cuadrado inmaduro, sus almidones no participan del proceso de ensilaje lo que pudo afectar el ambiente en el silo y promover la desnaturalización de las proteínas de los forrajes.

Los tratamientos evaluados poseen contenidos de fracción B3 menores a los reportados por Lanzas et al., (2009) (4,6% MS) para ensilados de alfalfa, salvo los tratamientos donde se utilizó *Arachis*, ya que estos fueron similares. Además, fueron menores a los datos presentados en el trabajo de Brown y Pitman, (1991) (8,0 – 10,4 % MS) en forrajes de *Indigofera hirsuta* y de *Aeschynomene americana*. Finalmente, los valores obtenidos en los tratamientos elaborados con *Cratylia* y *Arachis* son similares a los reportados por Alzueta et al., (2001) en forraje de *Vicia sativa* L. en llenado de fruto, pero menores en los tratamientos elaborados con *Erythrina* y *Vigna*. Todo lo anterior, reafirma lo determinado en este trabajo acerca del efecto de la especie de leguminosa en el contenido de esta fracción, tanto en los forrajes como en el silo, esto concuerda con lo encontrado por Guo et al., (2008) y Grabber, (2009).

### 5.5.3. Proteína indigestible (Fracción C)

En esta investigación se obtuvieron valores entre 1,6 y 3,7% de la materia seca, lo que representa 9,97 – 24,03% de la proteína cruda total (Cuadro 1 y Figura 1). La concentración de la fracción C en los tratamientos evaluados fue afectada por los efectos individuales de la especie de leguminosa y por la fuente de carbohidratos utilizada.

De esta manera, la *Vigna unguiculata*, fue la que presentó menor concentración ( $p < 0,05$ ) de esta fracción (2,0% MS), mientras que la *Cratylia argentea* y la *Erythrina poeppigiana*, fueron las que mostraron el promedio más alto de esta fracción (2,9 y 3,5% MS, respectivamente). Esto puede ser debido a que tanto la *Cratylia* como la *Erythrina* son forrajes leñosos y de mayor edad, con mayor contenido de lignina, y en consecuencia, mayor contenido de nitrógeno ligado a la lignina. Esto coincide con lo reportado por Mafongoya et al., (1998) y Alzueta et al., (2001) quienes detectaron que conforme aumenta la madurez de la planta, también aumenta la concentración de la fracción C en el forraje.

En lo que respecta a la fuente de carbohidratos los tratamientos donde se utilizó pulpa de cítricos deshidratada y fruto de guineo cuadrado, presentaron mayor contenido de proteína indigestible (2,9 y 3,1% MS, respectivamente). Ambos aditivos aumentan de maneras distintas el contenido de la fracción C en los ensilados. La pulpa de cítricos deshidratada aumenta la cantidad de proteína indigestible, debido a que durante la elaboración de la PCD, la exposición al calor aumenta la cantidad de transformaciones por reacciones de tipo Maillard (Garau et al., 2007), por lo que al utilizar este material se

incrementa esta fracción en las mezclas forrajeras. Esto coincide con lo encontrado por López-Herrera et al., (2016) quienes detectaron que al utilizar la pulpa de cítricos como aditivo en ensilados de corona de piña se incrementa la fracción C.

Por su parte el guineo cuadrado permite el aumento de las reacciones de Maillard en el silo, debido a que no provee adecuado aporte de carbohidratos solubles, situación que pudo propiciar aumento de temperatura en el silo (Goering et al., 1973; Adesogan, 2006). También Chalupa y Sniffen, (1996) Betancourt de Flores et al., (2002), determinaron que durante proceso de ensilaje puede ocurrir aumento en la concentración de proteína insoluble por transformación de los nutrimentos debidas a reacciones tipo Maillard.

Las mezclas ensiladas evaluadas presentaron contenidos de fracción C similares a los reportados por Gierus et al., (2012) (2,37% MS) para ensilados de alfalfa y a los valores publicados en el trabajo de Guo et al., (2008) (2,60% MS). Aunque mayores a las concentraciones obtenidas por Seguin et al., (2002) con forraje fresco de diferentes especies de leguminosas de clima templado. También fueron mayores a los encontrados por Betancourt de Flores et al., (2002) (1,95% MS) en ensilados de *Leucaena leucocephala*. Estas diferencias pueden ser debidas a la concentración de esta fracción en cada una de las especies forrajeras utilizadas y si los forrajes estuvieron expuestos a calor durante el ensilaje.

#### 5.5.4. Relación entre fracciones de la proteína cruda

##### 5.5.4.1. Proteína degradable en el rumen.

Los ensilados evaluados contienen entre 30,6 y 60,4% PC de proteína degradable en el rumen (Cuadro 2). Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, estas provienen de la interacción entre la especie de leguminosa forrajera y la fuente de carbohidratos adicionado (Cuadro 2). Esta fracción hace referencia a la proteína que se degrada en el rumen y es convertida en proteína microbiana o excretada como urea en la orina (Reynal y Broderick, 2005), por esta razón los ensilados deben complementarse con alimentos más energéticos que permitan aprovechar mejor los nutrimentos (Dewhurst et al., 2009).

Cuadro 2. Contenido de proteína degradable en el rumen (PDR), proteína no degradable en el rumen (PnDR) y proteína indigestible (PI), en las mezclas de leguminosas con

diferentes fuentes de carbohidratos a 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	CHO*	PDR	PnDR	PI**
		(% PC)	(% PC)	(% PC)
Vigna	Melaza	60,4 <sup>a</sup>	39,6 <sup>c</sup>	13,2 <sup>b</sup>
	PCD	48,7 <sup>b</sup>	51,3 <sup>b</sup>	14,5 <sup>b</sup>
	Maíz	49,1 <sup>b</sup>	50,9 <sup>b</sup>	9,9 <sup>b</sup>
	Guineo	30,6 <sup>c</sup>	69,4 <sup>a</sup>	17,2 <sup>a</sup>
Arachis	Melaza	32,1 <sup>c</sup>	67,9 <sup>a</sup>	12,8 <sup>b</sup>
	PCD	36,7 <sup>c</sup>	63,3 <sup>a</sup>	14,1 <sup>b</sup>
	Maíz	31,0 <sup>c</sup>	68,9 <sup>a</sup>	13,0 <sup>b</sup>
	Guineo	32,6 <sup>c</sup>	67,5 <sup>a</sup>	18,2 <sup>a</sup>
Cratylia	Melaza	44,7 <sup>b</sup>	55,3 <sup>b</sup>	15,5 <sup>b</sup>
	PCD	39,1 <sup>c</sup>	60,9 <sup>a</sup>	19,6 <sup>a</sup>
	Maíz	47,3 <sup>b</sup>	52,6 <sup>b</sup>	19,4 <sup>a</sup>
	Guineo	50,4 <sup>b</sup>	49,6 <sup>b</sup>	19,6 <sup>a</sup>
Erythrina	Melaza	36,4 <sup>c</sup>	63,6 <sup>a</sup>	21,1 <sup>a</sup>
	PCD	38,5 <sup>c</sup>	61,6 <sup>a</sup>	22,7 <sup>a</sup>
	Maíz	42,2 <sup>b</sup>	57,8 <sup>b</sup>	18,8 <sup>a</sup>
	Guineo	36,3 <sup>c</sup>	63,7 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>
Valor de p				
Leguminosa (L)		<0,0001	<0,0001	<0,0001
CHO (C)		-	-	0,0001
LxC		0,0015	0,0015	-
E.E.***		3,77	3,77	1,34

\* Fuente de carbohidratos

\*\* PI = % fracción C

\*\*\* Error estándar

Letras distintas en la misma columna son diferentes (p<0,05)

En lo que respecta a la especie de leguminosa, los ensilados tanto de Vigna (47,2% PC) como de Cratylia (45,4% PC) fueron las que presentaron mayor concentración de proteína degradable en el rumen (p<0,05), mientras que Erythrina (38,4% PC) y Arachis (33,1% PC), fueron las que mostraron menor (p<0,05) concentración de PDR. Estas diferencias no tienen relación con el hábito de crecimiento, ya que no influye si la leguminosa es herbácea o arbustiva, lo que sugiere un efecto propio de cada especie. Con respecto a la fuente de carbohidratos durante el ensilaje, tal y como se señala en el trabajo de Grabber, (2009) el valor de fracción A de los ensilados puede tener 59% de variación debido al grado de proteólisis que haya ocurrido durante el ensilaje.

Slottner y Bertilsson, (2006) respaldan lo anterior, ya que explican que durante el proceso de ensilaje ocurren procesos de proteólisis que dependen de factores como temperatura, pH, compuestos inhibidores y el contenido de materia seca del forraje. De esta manera, ensilajes donde no se conocen las características de los forrajes a ensilar y

no se agrega aditivos cuando se requiera para asegurar ensilados de calidad, permiten la degradación de las proteínas a amonio, lo esto aumenta el nitrógeno amoniacal en el silo, que en consecuencia aumenta la cantidad de fracción A del ensilado.

Los ensilados que se elaboraron con *Arachis* y *Erythrina* presentaron contenidos de proteína degradable en el rumen similares a los reportados por WingChing y Rojas, (2007) (35,8% PC) para ensilados de *Arachis pintoi* con 50 días de fermentación. Sin embargo, los ensilados elaborados con *Vigna* y *Cratylia* presentaron valores mayores (31,8% y 26,8%, respectivamente). Todos los tratamientos presentaron valores menores a los reportados en el trabajo de Guo et al., (2008) en ensilados de alfalfa sin aditivos (69,9% PC). Esto debido a diferencias propias de cada especie de leguminosa y al grado de participación de cada fuente de carbohidratos durante el ensilaje.

#### 5.5.4.2. Proteína no degradable en el rumen.

Los materiales ensilados presentaron valores entre 39,6 y 69,4% PC de proteína de sobrepaso (Cuadro 2). Al igual que con la proteína degradable, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, que provienen de la interacción entre la especie de leguminosa forrajera y a la fuente de carbohidratos (Cuadro 2).

De esta manera, los ensilados de *Erythrina* y *Arachis*, fueron las que presentaron en promedio (sin ser diferentes entre si), mayor concentración de proteína sobrepasante (61,7 y 66,9% PC, respectivamente), mientras que los ensilados elaborados con *Vigna* y *Cratylia* (sin diferencias entre ellas) fueron las que mostraron menor concentración de proteína sobrepasante (52,8 y 54,6% PC, respectivamente). Esto sugiere un efecto de especie, ya que no hay una tendencia en cuanto al hábito de crecimiento y madurez de la planta, lo que coincide con lo reportado en el trabajo de Guo et al., (2008).

Todos los tratamientos presentaron concentración de proteína no degradable en el rumen mayor que las encontradas por Foster et al., (2011) (4,33 – 13,80% PC), quienes trabajaron con henolajes de leguminosas de clima tropical, esto puede ser debido a diferencias en el método de conservación. Además, mientras que los tratamientos elaborados con *Erythrina* y *Arachis* fueron similares que los datos obtenidos por WingChing y Rojas, (2007) (62,46 – 67,9% PC) para ensilados de *Arachis pintoi* con 50 – 60 días de fermentación, los ensilados elaborados con *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea* presentaron valores menores. Ello es debido a la interacción de los forrajes con las fuentes de carbohidratos utilizadas que pudieron afectar la composición final de los

ensilados, ya que el *Arachis* utilizado en esta investigación tiene 10 días menos de edad que el utilizado en el experimento de WingChing y Rojas, (2007).

Finalmente, todos los ensilados de esta investigación mostraron valores mayores de proteína indigestible al compararlos con los resultados publicados por Lanzas et al., (2007) (7,4% PC) con ensilados de alfalfa. Esto puede ser debido a diferencias entre las especies de leguminosas, diferencias por ser plantas de clima tropical contra la alfalfa que es de clima templado y diferencias producidas por las fuentes de carbohidratos utilizadas que pueden aumentar la cantidad de proteína indigestible o propiciar que aumente esta fracción en el ensilado.

## **5.6. CONCLUSIONES**

Los ensilados analizados presentaron un contenido elevado de fracción A en comparación con las otras fracciones de la proteína cruda, sobretodo la fracción B1.

También se determinó que la pulpa de cítricos deshidratada puede aumentar la concentración de fracción B3 y C en los ensilados debido a que por sí misma tiene alto contenido de esta fracción. Por otra parte, los ensilados donde se utilizó guineo cuadrado presentaron incremento en las fracciones B3 y C, debido a que se promueve el calentamiento de la masa ensilada, lo que aumenta las reacciones Maillard en el silo.

Los ensilados analizados poseen un contenido de proteína degradable elevado, que debe ser balanceado con fuentes energéticas que permitan reducir las pérdidas de nitrógeno por orina. Sin embargo poseen adecuado contenido de proteína de sobrepaso que puede ser utilizado para mejorar la alimentación de animales alta producción, ya que habría mayor flujo de proteína al intestino delgado.

## **5.7. LITERATURA CITADA**

- Adesogan, A.T. 2006. Factors affecting corn silage quality in hot and humid climates. 17th Florida Ruminant Nutrition Symposium. Florida. 1-2 February IFAS Extension. University of Florida. 108 – 127.
- Alzueta, C., Caballero, R., Rebole, A., Trevino, J., Gil, A. 2001. Crude protein fractions in common vetch (*Vicia sativa* L.) fresh forage during pod filling. *Journal of Animal Science* 79(9): 2449 – 2455.

- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD
- Betancourt de Flores, M., Clavero, T., Razz, R. (2002). Compuestos nitrogenados en ensilajes de *Leucaena leucocephala*. *Revista Científica* 12(2): 566 – 568
- Brown, W.F., Pitman, W.D. 1991. Concentration and degradation of nitrogen and fibre fractions in selected tropical grasses and legumes. *Tropical Grasslands* 25(1): 305 – 312.
- Castillo, M., Rojas, A., WingChing, R. 2009. Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna (*Vigna radiata*). *Agronomía Costarricense* 33(1):133 – 146.
- Chalupa, W., Sniffen, C.J. 1996. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle—today and tomorrow. *Animal Feed Science and Technology* 58(1): 65 – 75.
- Charmley, E. 2001. Towards improved silage quality-a review. *Canadian Journal of Animal Science* 81(2): 157 – 168.
- Church D.C., Pond W.G., Pond K.R. 2003. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. LIMUSA WILEY. México D.F. 636 p
- Cohen, D.C., Stockdale, C.R. Doyle, P.T. 2006. Feeding an energy supplement with white clover silage improves rumen fermentation, metabolisable protein utilisation, and milk production in dairy cows. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 367–375
- Dewhurst, R.J., Delaby, L., Moloney, A., Boland, T., Lewis, E. 2009. Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48: 167-187.
- Di Rienzo J A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo Y.C. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Foster, J.L., Carter J.N., Sollenberger L.E., Blount A.R., Myer R.O., Maddox M.K., Phatak S.C., Adesogan A.T. 2011. Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of ensiled warm-season legumes and bahiagrass. *Journal of Dairy Science* 94(4): 2042 – 2050.
- Fulkerson, W.J., Neal, J.S., Clark, C.F., Horadagoda, A., Nandra, K.S., Barchia, I. 2007. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: grasses and legumes. *Livestock Science* 107(2): 253 – 264.
- Garau, M.C., Simal, S., Rossello, C., Femenia, A. 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry* 104(3): 1014 – 1024.

- Gierus, M., Kleen, J., Loges, R., Taube, F. 2012. Forage legume species determine the nutritional quality of binary mixtures with perennial ryegrass in the first production year. *Animal Feed Science and Technology* 172(3): 150-161.
- Givens, D.I., Rulquin, H. 2004. Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 114(1): 1 – 18.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., Hemken, R.W. 1973. Relative susceptibility of forages to heat damage as affected by moisture, temperature, and pH. *Journal of Dairy Science* 56(1): 137 – 143.
- Grabber, J.H. 2009. Protein fractions in forage legumes containing protein-binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. *Animal Feed Science and Technology* 151(3): 324 – 329.
- Guo, X. S., Ding, W. R., Han, J. G., Zhou, H. 2008. Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Feed Science and Technology* 142(1): 89 – 98.
- Hiriart M. 2008. *Ensilados. Procesamiento y Calidad*. Editorial Trillas. 2da edición. México. 110p.
- Lanzas, C., Tedeschi, L.O., Seo, S., Fox, D.G. 2007. Evaluation of protein fractionation systems used in formulating rations for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90(1): 507 – 521.
- Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57(4): 347 – 358.
- López-Herrera, M., WingChing-Jones, R., Rojas-Bourrillon, A. 2016. Bromatología de ensilados de corona de piña con pulpa de cítricos, heno y urea. *Agronomía Mesoamericana* 27(1): 37 – 47.
- Mafongoya, P.L., Nair, P.K.R., Dzwela, B.H. 1998. Mineralization of nitrogen from decomposing leaves of multipurpose trees as affected by their chemical composition. *Biology and Fertility of Soils* 27(2): 143 – 148.
- McDermott, J.J., Staal, S.J., Freeman, H.A., Herrero, M., Van de Steeg, J.A. 2010. Sustaining intensification of smallholder livestock systems in the tropics. *Livestock Science* 130(1): 95-109.
- McDonald P. 1981. *The Biochemistry of Silage*. John Wiley & Sons. Ltd. New York. 226 pp.
- Miquilena, E., Ferrer, O., & Clavero, T. (1995). Efecto de tres frecuencias de corte y dos densidades de siembra sobre las fracciones nitrogenadas en hojas y tallos de *Gliricidia sepium*. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 12(2): 193 – 207.

- National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National Academy Press. Washington DC. 408 p.
- Pezo, D, Ibrahim, M. 1998. Sistemas silvopastoriles. Colección de Modelos de Enseñanza Agroforestal No. 2. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Reynal, S.M., Broderick, G.A. 2005. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88(11): 4045 – 4064.
- Sampath, K.T., Chandrasekhariah, M., Praveen, U.S. 2005. Effect of bypass protein on milk production of crossbred cows-a field study. *Indian Journal of Animal Nutrition* 22(1): 41 – 43.
- Seguin, P., Mustafa, A.F., Sheaffer, C.C. 2002. Effects of soil moisture deficit on forage quality, digestibility, and protein fractionation of Kura clover. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188(4): 260 – 266.
- Singh, S., Kushwaha, B.P., Nag, S.K., Mishra, A.K., Singh, A., Anele, U.Y. 2012. In vitro ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology* 178(1): 2 – 11.
- Slottner, D., Bertilsson, J. 2006. Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127(1): 101 – 111.
- Sniffen C.J., O'Connor J.D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russel J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrates and protein availability. *Journal of Animal Science* 70: 3562 – 3577.
- Steinfeld, H., Wassenaar, T., Jutzi, S. 2006. Livestock production systems in developing countries: status, drivers, trends. *Revue Scientifique et Technique* 25(2): 505-516.
- Tobía C., Rojas A., Villalobos E., Soto H., Uribe L. 2004. Sustitución parcial el alimento balanceado por ensilaje de soya y su efecto en la producción y calidad de la leche de vaca, en el trópico húmedo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(2): 27 – 35.
- Vargas R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37pp.
- Walli, T.K. 2005. Bypass protein technology and the impact of feeding bypass protein to dairy animals in tropics: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences* 75(1): 135 – 142.
- WingChing-Jones, R., Rojas-Bourrillón, A. 2006. Dinámica fermentativa y fraccionamiento proteico durante el ensilaje de maní forrajero (CIAT 17434). *Agronomía Mesoamericana* 18(1): 55 – 63.

Yitbarek, M.B., Tamir, B. 2014. Silage Additives: Review. Open Journal of Applied Sciences (4): 258 – 274

## **CAPITULO 6.**

**EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS, ESPECIE DE LEGUMINOSA Y  
ENSILAJE EN LA DIGESTIBILIDAD DE LA FIBRA Y LA PRODUCCION DE METANO  
*IN VITRO.***

## CAPITULO 6. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBOHIDRATOS, ESPECIE DE LEGUMINOSA Y ENSILAJE EN LA DIGESTIBILIDAD DE LA FIBRA Y LA PRODUCCION DE METANO *IN VITRO*.

### 6.1. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la fuente de carbohidratos, especie de leguminosa y forma de procesamiento del forraje en la digestibilidad de la FDN y emisión *in vitro* de metano de mezclas forrajeras. El experimento fue realizado entre 2015 y 2016, la parte experimental se desarrolló en Montes de Oca y los forrajes fueron cosechados en Upala, Costa Rica. Los forrajes fueron picados hasta obtener una partícula promedio de 3 cm, y colocadas en bolsas de empaque al vacío, con capacidad para 5 kg ahí se combinaron en un arreglo multifactorial 4x4x2, cuatro especies de leguminosas (*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoii*, *Cratylia argentea*, *Erythrina poeppigiana*), 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido y fruto inmaduro de guineo cuadrado) y dos formas del forraje (fresco, ensilado), para un total de 32 tratamientos. A todos los tratamientos se les agregó inóculo bacteriano artesanal (1 L/t). La estimación de la fibra indigestible se hizo utilizando una ecuación de predicción a partir de la lignina. La medición del metano se realizó mediante incubadores de vidrio y cromatografía de gases. Además se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles por medio de cromatografía líquida de alto desempeño. También se realizó un metanálisis para estimar el contenido de taninos en los forrajes. El contenido y digestibilidad de la FDN se correlacionó con la producción de metano ( $\rho=0,42$ ), también se determinó que la concentración de taninos en estos forrajes tuvo efecto importante en la reducción del metano. La producción de metano se afectó por la especie de leguminosa forrajera, la fuente de carbohidratos y el ensilaje del forraje. Así, los tratamientos que produjeron menos metano fueron los elaborados con *Erythrina* ( $12,5\pm 1,42$  L CH<sub>4</sub>/kg MSD), mientras que los de mayor producción del gas fueron los de *Vigna* ( $16,2\pm 1,7$  L CH<sub>4</sub>/kg MSD) debido a mayor contenido de taninos condensados (3,4% MS y 0,24% MS, respectivamente) en el forraje y mayor concentración de FDN digestible ( $73,0\pm 3,8\%$  FDN y  $84,4\pm 3,5\%$  FDN, respectivamente). La fuente de carbohidratos que redujo más la producción de metano fue el maíz molido ( $12,6\pm 1,9$  L CH<sub>4</sub>/kg MSD), en cambio los tratamientos que produjeron mayor cantidad de gas fueron los de fruto de guineo cuadrado ( $15,8\pm 2,0$  L CH<sub>4</sub>/kg MSD), debido al tipo de almidón presente en el fruto, el cual no puede ser aprovechado en el rumen, en este caso no hubo cambios en la concentración de propionato, aunque si aumentó la concentración de acetato, comparado con el maíz. La estimación de la emisión de metano entérico en bovinos lecheros adultos fluctuó: entre 110,5 y 192,2 L CH<sub>4</sub>/día para animales de 454 kg y entre 187,9 y 277,0 L CH<sub>4</sub>/día en animales de 680 kg.

**Palabras clave:** Gases de efecto invernadero, Conservación de forrajes, Fermentación, Rumiantes

## 6.2. ABSTRACT

**Effect of carbohydrate source, legume species and silage on NDF digestibility and in vitro methane production.** The objective of this research was to determine the effect of carbohydrate source, legume species and forage processing in NDF digestibility and in vitro methane emission from forage mixtures. The experiment was carried out between 2015 and 2016, the experimental part was developed in Montes de Oca and forages were harvested in Upala, Costa Rica. The forages were chopped until they obtained an average particle of 3 cm, and placed in vacuum packing bags, with capacity for 5 kg, there were combined in a 4x4x2 multifactorial arrangement four legume species (*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea*, *Erythrina poeppigiana*), four sources of carbohydrates (sugar cane molasses, dehydrated citrus pulp, ground corn and unripe square banana) and two forms of forage (fresh, ensiled) for a total of 32 treatments. Bacterial inoculum (1 L / t) was added to all treatments. The estimation of the indigestible fiber was made using a prediction equation from lignin. Methane measurements were performed using glass incubators and gas chromatography. In addition, the concentration of volatile fatty acids was determined by means of high performance liquid chromatography. A meta-analysis was also performed to estimate the tannin content in forages. The content and NDF digestibility was correlated with the production of methane ( $\rho = 0.42$ ), it was also determined that the concentration of tannin in these forages had significant effect on the reduction of methane. Methane production was affected by the species of forage legume, the carbohydrate source of forage and silage.. Thus, the treatments that produced less methane were on average those produced with Erythrina ( $12.6 \pm 1.9$  L CH<sub>4</sub>/kg DDM), while those with higher gas production were on average the Vigna ( $16.2 \pm 1.9$  L CH<sub>4</sub>/kg DDM) Due to a higher content of condensed tannins (3.4% DM and 0.24% DM, respectively) in the forage and a higher concentration of digestible NDF ( $72.9 \pm 3.8\%$  NDF and  $84.4 \pm 3.5\%$  NDF, respectively). The source of carbohydrates that produced less methane was ground corn ( $12.6 \pm 1.9$  L CH<sub>4</sub>/kg DDM), whereas the treatments that produced the highest amount of this gas were those made with of saba banana ( $15.8 \pm 2.0$  L CH<sub>4</sub>/kg DDM), due to the type of starch present in the fruit, that cannot be exploited in the rumen, in this case there were no changes in propionate concentration, although the concentration of acetate increased compared to maize. The estimation of the enteric methane emission in adult dairy cattle varied between 110,5 - 192,2 L CH<sub>4</sub>/day for animals of 454 kg and between 187,95 - 277,03 L CH<sub>4</sub>/day in animals of 680 kg.

**Keywords:** Greenhouse gases, Forage conservation, Fermentation, Ruminants

### 6.3. INTRODUCCIÓN

El metano es un gas que se produce en el retículo-rumen como parte de los procesos de degradación de los componentes de los alimentos, principalmente los carbohidratos, en moléculas más sencillas, para ser aprovechados por los rumiantes como energía (Dijkstra et al., 2011; Duncan, 2014) en forma de ácidos grasos volátiles (propionato, acetato y butirato) (Buddle et al., 2011).

La concentración de estos gases depende del tipo de carbohidrato que se esté fermentando en el ambiente ruminal (Moss et al., 2000): De esta manera, dietas altas en fibra aumentan la producción de acetato y butirato (Cruz y Sánchez, 2000), y en consecuencia se incrementa la síntesis de metano en el rumen. Por el contrario, dietas más altas en almidones predisponen la producción de propionato en el rumen lo que reduce la producción de metano entérico (Jiao et al., 2013).

De acuerdo a Lascano y Cárdenas (2010), los rumiantes producen entre 21 y 25% del total de emisiones de metano antropogénico, por lo que son necesarias las tecnologías que permitan reducir las emisiones sin afectar la producción y rentabilidad de las explotaciones. En este entendido Boadi et al., (2004) reportan disminución del 33% en la producción de metano ruminal cuando se utilizan ensilados como fuente forrajera, ya que durante el ensilaje el contenido de fibra del forraje se reduce por consumo de la hemicelulosa (McDonald, 1981)

Por su parte Archiméde et al., (2011) señalan que el uso de leguminosas tropicales reduce las emisiones de metano con respecto a los pastos C4, debido a que poseen mayor contenido de nitrógeno, generalmente en rango de 12 a 30% (Flores et al., 1998). Esto coincide con las investigaciones de Hindrichsen et al., (2005) y, Shibata y Terada (2010), quienes indican que es posible reducir la producción de metano cuando se aumenta el nivel de proteína en la dieta de los rumiantes.

En cuanto a la fuente de carbohidratos, se menciona que las fibras fermentables aumentan la metanogénesis debido a su alto contenido de hemicelulosa, celulosa y pectinas (Van Soest, 1978); de esta manera, las pectinas son 2,8 veces más metanogénicas que la xilosa (componente de la hemicelulosa) y 6,75 veces más que los almidones (Czerkawski y Breckenridge, 1969, Hindrichsen et al., 2004). La capacidad de producción de metano de los azúcares depende del ambiente ruminal, ya que en

condiciones de pH mayor a 6, los azúcares van a la vía del ácido butírico (Hindrichsen et al., 2005), mientras que en condiciones de pH más ácido van a la vía del ácido propiónico (Dijkstra et al., 2011).

Por su parte, los almidones tienden a reducir la producción de metano debido a la disminución en las poblaciones de protozoarios, reducción del pH ruminal y alteración de la relación acetato:propionato (A:P) (Campabadal 1999, Hindrichsen et al., 2005, Duncan, 2014). Sin embargo, la alimentación con granos es limitada e ignora la importancia de los rumiantes como convertidores de alimentos fibrosos no aptos para el consumo humano (Grainger y Beauchemin, 2011). Además, el uso de concentrados representa una limitación económica para su uso en los sistemas de producción en el trópico (Lascano y Cárdenas, 2010), y su uso excesivo, sin precaución, puede provocar aparición de enfermedades metabólicas (Russell y Rychlik, 2001).

El objetivo de esta investigación fue determinar la digestibilidad de la FDN y la producción de metano *in vitro* a partir de mezclas forrajeras elaboradas con cuatro especies de leguminosas, cuatro fuentes de carbohidratos y dos formas de procesamiento del forraje.

## **6.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### *6.4.1. Ubicación del experimento*

La cosecha de los forrajes se realizó en la estación lluviosa, en la finca Agroecológica Vocaré ubicada en el cantón de Upala a 180 msnm, con precipitación promedio de 2500 mm anuales y temperatura promedio de 25 °C. La etapa experimental se realizó en el Campus Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica donde se encuentran los laboratorios del Centro de Investigaciones en Nutrición Animal (CINA) para análisis bromatológicos y de metano.

### *6.4.2. Forrajes y fuentes de carbohidratos utilizadas*

Las edades de corte de las leguminosas se fijaron de acuerdo al tipo de forraje (herbáceas o de corte) y edad, de manera que no sean forrajes muy maduros con alto contenido de fibra y lignina. Las edades de corte utilizadas fueron: *Vigna unguiculata* (40

días), *Arachis pintoi* (40 días), *Cratylia argentea* (75 días) y *Erythrina poeppigiana* (75 días). Las especies arbustivas fueron cosechadas a 1,20m de altura, mientras que las leguminosas herbáceas fueron cosechadas al nivel de suelo.

Los niveles de inclusión de las fuentes de carbohidratos fueron: melaza (6,3% p/p), pulpa de cítricos deshidratada (8,4% p/p), maíz molido (6,4% p/p) y fruto inmaduro de guineo cuadrado (*Musa acuminata x balbisiana*, Grupo ABB) (6,7% p/p) de manera que proporcionen 5% del total de carbohidratos no fibrosos de la mezcla. El 5% restante para alcanzar el 10 – 15% de carbohidratos no fibrosos, fue aportado por las leguminosas. El fruto inmaduro de guineo cuadrado se encontraba en estado inmaduro y completamente engrosado al momento de la cosecha.

#### 6.4.3. Diseño experimental y tratamientos

El experimento consta de un diseño factorial completamente aleatorizado (4x4), con 4 fuentes de carbohidratos (melaza de caña de azúcar, pulpa de cítricos deshidratada, maíz molido, fruto de guineo cuadrado) y 4 especies de leguminosas (*Vigna unguiculata*, *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana*). Todos los tratamientos cuentan con 10 – 15% de carbohidratos no fibrosos para asegurar una adecuada fermentación de acuerdo a lo planteado por Vargas, (1979) e Hiriart, (2008).

A todos los tratamientos se les agregó inóculo bacteriano artesanal (elaborado por fermentación anaeróbica durante 30 días, a partir de suero de leche, leche y melaza – *Lactobacillus* 1,0 x 10<sup>9</sup> UFC/mL) (1L/tonelada) con base en el peso en fresco. Cada tratamiento fresco fue repetido 3 veces y cada tratamiento ensilado fue repetido 4 veces, por lo tanto, el experimento contó con un total de 112 microsilos. Finalmente, cada bolsa se consideró como una unidad experimental.

#### 6.4.4. Procedimiento experimental

Se tomaron por triplicado muestras de 3 kg de material fresco de cada tratamiento con la finalidad de analizar el material antes del ensilaje. El ensilaje se llevó a cabo en microsilos de bolsa, cada unidad se llenó con 4 kg de mezcla para ensilar. En ambos casos se utilizaron bolsas de polietileno para empaque al vacío con capacidad para 5 kg y con un grosor de 0,0063 mm. El material fue depositado y compactado a mano y el aire se extrajo con una aspiradora. Todo el proceso de elaboración y sellado de los silos se realizó en la finca Vocaré.

Posterior a la eliminación del aire, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva, se transportaron en vehículo a Montes de Oca y se colocaron en condiciones de laboratorio (25°C, 75% humedad relativa, aproximadamente) para que estuvieran protegidas del ataque de aves, roedores o labores rutinarias que podrían perjudicar el proceso de ensilaje.

#### 6.4.5. Variables a evaluar

A los 50 días de fermentación se realizó la apertura de los silos, y los ensilados fueron llevados al laboratorio de bromatología de forrajes del CINA para determinar: concentración de fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y lignina (Van Soest et al. 1991). Además se determinó el contenido de carbohidratos no fibrosos (NRC, 2001). También se estimó el contenido de fibra en detergente neutro indigestible (inFDN) utilizando la ecuación de Chandler (1980) y por diferencia se calculó la fibra en detergente neutro digestible (dFDN). Finalmente se estimó el contenido de total de nutrimentos digestibles TND a partir de las ecuaciones elaboradas por Addams et al., (1995).

Para estimar la concentración de taninos condensados en las leguminosas se realizó un análisis de diferentes trabajos publicados en revistas indexadas incluidas en las bases de datos: Scopus, Proquest, Springer, CSIRO, CABI, Cambridge Journals, Wiley Online Library. Los datos obtenidos fueron tabulados en Excel y analizados mediante un análisis de varianza para determinar diferencias estadísticas entre las especies de leguminosas.

Para la determinación de la producción de metano se utilizó una adaptación de la metodología descrita en el trabajo de Meale et al. (2012). Para este fin se pesó 1g de forraje seco molido combinado con licor ruminal de animales fistulados con una dieta conocida (0,5 kg de cítricos; 0,5 kg de VapFeed; 0,3 kg de melaza; 0,5 kg de soya; 38 kg ensilaje) y soluciones amortiguadoras y minerales. Las mezclas forrajeras fueron incubadas durante 24 horas a  $39\pm 0.5$  °C, en recipiente de vidrio con capacidad para 250 mL en un equipo ANKOM Gas Production System. Los valores obtenidos fueron corregidos con un blanco que contenía solamente licor ruminal, la producción de gas fue medida con sensores ubicados en la parte superior de los frascos de vidrio y guardados en el programa informático del incubador ANKOM Gas Production System.

A 24 horas de incubación se procedió a la colecta del gas, la muestra se tomó directamente en el septo del recipiente utilizando un tubo de Vacutainer con capacidad para 20 mL y para la cuantificación de la concentración de metano se utilizó un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7820A con una columna 19091P-MS4 y un detector de masas de simple cuadrupolo modelo 5977E Agilent Technologies. La producción de metano se expresa como litros de metano por kilogramo de materia seca (MS) y como litros de metano por kilogramo de materia seca digestible (MSD).

Después de tomar la muestra de gases, los recipientes fueron retirados de la incubadora y el licor ruminal remanente fue transvasado a tubos de ensayo, a los que se les agregó 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado para eliminar las bacterias presentes. A continuación, se procedió a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos para lograr la precipitación de los materiales sólidos sin digerir. El líquido supernatante fue almacenado a 4-5 °C, mientras se realizó el centrifugado a todos los tratamientos. Para cuantificar la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV) en el licor ruminal (% del total de ácidos grasos volátiles), se analizó el líquido supernatante en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Agilent Technologies modelo 1260 Infinity con una columna Agilent Hi-Plex H.

Además, se simuló un escenario de emisión de metano entérico con los datos de producción de metano de los tratamientos con mayor y menor producción de este gas. Para este fin se utilizaron las tablas de requerimientos del NRC (2001) de ellas se tomaron los valores para una vaca de 454 kg de peso vivo que produce 10 kg ó 30 kg leche/día y, para una vaca de 680 kg de peso vivo que produce 25 kg ó 45 kg leche/día. En ambos casos las vacas tienen una dieta de 68% TND, están en lactancia media estimada a 90 días en producción y producen leche que contiene 4,0% de grasa y 3,0% de proteína verdadera.

#### *6.4.6. Análisis de la información*

Para el análisis de la información se utilizó un Modelo ANOVA de INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2013) considerando como efectos principales: el ensilaje, la fuente de carbohidratos, la especie de leguminosa y la interacción de todas las fuentes principales. Además, se realizaron análisis de correlación de Pearson, análisis de componentes principales y correlaciones canónicas, para determinar la relación entre las variables nutricionales, los parámetros de fermentación ruminal y la producción de metano. En

todos los análisis estadísticos realizados se utilizó la prueba de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Para las diferencias en las medias obtenidas en la simulación de emisión metano entérico se utilizaron intervalos de confianza con  $\alpha=0,05$ .

## 6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.5.1. Digestibilidad de la FDN

Los resultados del análisis de la variable fibra en detergente neutro indigestible indican que existen diferencias debidas a la interacción entre la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos ( $p<0,0393$ ), además a la interacción entre la fuente de carbohidratos y la forma de procesamiento del forraje ( $p<0,004$ ). De esta manera, las especies de leguminosas arbustivas (*Erythrina* y *Cratylia*) fueron las que presentaron mayor contenido de fibra detergente neutro indigestible ( $27,0\pm3,8$  y  $28,2\pm4,4$  %), mientras que para *Vigna* y *Arachis* se obtuvo valores de  $15,6\pm3,5$  y  $14,9\pm8,9$ % FDN, respectivamente. Estas diferencias son debidas al contenido de lignina en los tejidos de las plantas (Cuadro 1), donde las leguminosas arbustivas poseen mayor concentración de este componente debido a que son forrajes de mayor edad y madurez fisiológica (Arthington y Brown, 2005). Esto coincide con los hallazgos de López-Herrera y Briceño-Arguedas (2016) quienes indican que el contenido de lignina en la *Cratylia* varía entre 11,9 y 16,3 % MS, de acuerdo a la edad del forraje y época del año en que se cosecha el forraje.

En cuanto a la fuente de carbohidratos, los tratamientos en los que incorporó fruto inmaduro de guineo cuadrado (Cuadro 1), fueron los que presentaron mayor contenido de fibra detergente neutro indigestible ( $24,8\pm5,9$ % FDNi). Esto puede ser debido al aporte de lignina que realizan las cáscaras de las musáceas, ya que el valor de lignina en las cáscaras de los frutos puede oscilar entre 6 y 16,8% MS (Emaga et al., 2008; Mohapatra et al., 2010). Este mismo efecto fue determinado en la investigación de López-Herrera et al., (2015) quienes analizaron ensilados de pasto *Pennisetum purpureum* con fruto de plátano Pelipita en estado inmaduro. Por otra parte, los tratamientos con menor contenido de fibra indigestible fueron los elaborados con: melaza ( $19,4\pm5,9$ % FDNi), PCD ( $20,7\pm7,3$ % FDNi) y maíz ( $20,6\pm8,6$ % FDNi), y no hubo diferencias entre ellos. Esto puede ser debido al menor contenido de lignina en estas fuentes utilizadas comparado en el de los frutos de guineo cuadrado, tal y como se mencionó.

Cuadro 1. Valores de fibra en detergente neutro, fibra en detergente neutro indigestible y fibra en detergente neutro digestible, de las mezclas forrajeras en forma fresca, antes del ensilaje y con 50 días de fermentación. San José, Costa Rica. 2016.

Forraje	Leguminosa	CHO*	FDN** (%MS)	Lignina (% MS)	inFDN** (%FDN)	dFDN** (%FDN)
Fresco	Vigna	Melaza	37,6 <sup>a</sup>	5,93 <sup>a</sup>	13,4 <sup>a</sup>	86,6 <sup>c</sup>
		PCD	45,9 <sup>b</sup>	5,44 <sup>a</sup>	13,2 <sup>a</sup>	85,8 <sup>c</sup>
		Maíz	38,5 <sup>a</sup>	4,79 <sup>a</sup>	14,9 <sup>a</sup>	85,1 <sup>c</sup>
		Guineo	43,2 <sup>b</sup>	7,39 <sup>a</sup>	20,8 <sup>b</sup>	79,2 <sup>b</sup>
	Arachis	Melaza	38,4 <sup>a</sup>	5,59 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>	85,8 <sup>c</sup>
		PCD	43,8 <sup>b</sup>	5,91 <sup>a</sup>	13,1 <sup>a</sup>	86,9 <sup>c</sup>
		Maíz	42,8 <sup>b</sup>	6,19 <sup>a</sup>	11,5 <sup>a</sup>	88,5 <sup>c</sup>
		Guineo	46,3 <sup>b</sup>	8,66 <sup>b</sup>	17,8 <sup>b</sup>	82,3 <sup>b</sup>
	Cratylia	Melaza	50,2 <sup>b</sup>	9,43 <sup>b</sup>	22,6 <sup>b</sup>	77,4 <sup>b</sup>
		PCD	51,6 <sup>b</sup>	10,80 <sup>b</sup>	25,9 <sup>b</sup>	74,1 <sup>b</sup>
		Maíz	55,0 <sup>c</sup>	13,20 <sup>c</sup>	31,7 <sup>c</sup>	68,3 <sup>a</sup>
		Guineo	55,9 <sup>c</sup>	13,90 <sup>c</sup>	33,4 <sup>c</sup>	66,6 <sup>a</sup>
	Erythina	Melaza	49,9 <sup>b</sup>	10,27 <sup>b</sup>	24,7 <sup>b</sup>	75,3 <sup>b</sup>
		PCD	47,7 <sup>b</sup>	9,97 <sup>b</sup>	23,9 <sup>b</sup>	76,1 <sup>b</sup>
		Maíz	55,3 <sup>c</sup>	13,00 <sup>c</sup>	31,2 <sup>c</sup>	68,8 <sup>a</sup>
		Guineo	56,9 <sup>c</sup>	12,43 <sup>c</sup>	29,8 <sup>c</sup>	70,2 <sup>a</sup>
Ensilado	Vigna	Melaza	35,9 <sup>a</sup>	5,63 <sup>a</sup>	13,0 <sup>a</sup>	83,9 <sup>c</sup>
		PCD	44,1 <sup>b</sup>	6,63 <sup>a</sup>	13,9 <sup>a</sup>	86,1 <sup>c</sup>
		Maíz	36,7 <sup>a</sup>	5,51 <sup>a</sup>	11,8 <sup>a</sup>	86,8 <sup>c</sup>
		Guineo	47,3 <sup>b</sup>	8,53 <sup>b</sup>	19,7 <sup>b</sup>	80,3 <sup>b</sup>
	Arachis	Melaza	36,2 <sup>a</sup>	6,68 <sup>a</sup>	13,5 <sup>a</sup>	86,5 <sup>c</sup>
		PCD	36,2 <sup>a</sup>	5,78 <sup>a</sup>	15,9 <sup>a</sup>	84,1 <sup>c</sup>
		Maíz	31,9 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>	13,2 <sup>a</sup>	86,8 <sup>c</sup>
		Guineo	41,7 <sup>b</sup>	8,23 <sup>b</sup>	20,5 <sup>b</sup>	79,5 <sup>b</sup>
	Cratylia	Melaza	44,3 <sup>b</sup>	11,23 <sup>b</sup>	26,9 <sup>b</sup>	73,1 <sup>b</sup>
		PCD	48,4 <sup>b</sup>	12,45 <sup>c</sup>	29,9 <sup>c</sup>	70,1 <sup>a</sup>
		Maíz	42,9 <sup>b</sup>	11,25 <sup>b</sup>	27,0 <sup>b</sup>	73,0 <sup>b</sup>
		Guineo	44,9 <sup>b</sup>	11,60 <sup>b</sup>	27,8 <sup>b</sup>	72,2 <sup>b</sup>
	Erythina	Melaza	42,5 <sup>b</sup>	10,02 <sup>b</sup>	23,4 <sup>b</sup>	76,6 <sup>b</sup>
		PCD	46,4 <sup>b</sup>	11,63 <sup>b</sup>	27,6 <sup>b</sup>	72,4 <sup>b</sup>
		Maíz	42,7 <sup>b</sup>	10, <sup>58b</sup>	25,4 <sup>b</sup>	74,6 <sup>b</sup>
		Guineo	47,9 <sup>b</sup>	12,55 <sup>c</sup>	30,1 <sup>c</sup>	69,9 <sup>a</sup>
E.E. ***			1,82	0,60	1,43	1,43

\* Fuentes de carbohidratos

\*\* FDN=Fibra en detergente neutro, inFDN= Fibra en detergente neutro indigestible, dFDN= Fibra en detergente neutro digestible

\*\*\* Error estándar

Letras en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente (p<0,05)

De acuerdo a Krizsan y Huhtanen (2013), el incremento en la cantidad de fibra detergente neutro indigestible reduce la digestibilidad de la materia orgánica fermentándose en el rumen, lo que en consecuencia, reduce el valor del forraje en términos nutricionales. De esta manera, conocer la digestibilidad de los forrajes es crítico para una adecuada alimentación de los rumiantes (Oba y Allen, 1999). Estos autores indican que los ensilados de maíz poseen una concentración de fibra detergente neutro indigestible de 12,9% MS. Por su parte, Jančík et al., (2008) indican que los pastos de clima templado poseen entre 1,8 y 17,6% MS de fibra detergente neutro indigestible. De

esta manera, los tratamientos evaluados en esta investigación se consideran materiales de buena calidad, ya que los valores de fibra en detergente neutro indigestible fluctuaron entre 2,6 y 19,8% MS

#### 6.5.2. Producción de metano *in vitro*

Se obtuvo que la especie de leguminosa, la fuente de carbohidratos y el ensilaje, generaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ( $p < 0,0001$ ) en la producción de metano. También, mediante el análisis de componentes principales se logró determinar dos grupos; uno conformado por el conjunto de las variables de composición nutricional (FDN, FDA, Lignina, iFDN y dFDN) y otro por las variables de fermentación ruminal (ácidos: acético, propiónico y butírico). Además, a través del análisis de correlaciones canónicas se determinó que en conjunto, las variables nutricionales correlacionan ( $\rho = 0,95$ ) con las variables de fermentación ruminal incluida la producción de metano. También se detectó que la hemicelulosa y los carbohidratos no fibrosos correlacionan ( $\rho = 0,40$  y  $-0,41$ , respectivamente) con la producción de metano *in vitro* (Cuadro 2).

En cuanto a las diferencias por especie de leguminosa, los tratamientos que presentaron mayor producción de metano por kilogramo de materia seca digestible, fueron los que se elaboraron a partir de *Vigna*, ( $16,2 \pm 1,7$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible (MSD)), mientras que los tratamientos que mostraron menor producción de metano fueron los que se elaboraron con *Erythrina*, ( $12,5 \pm 1,42$  L CH<sub>4</sub>/kg de MSD). Por su parte, los tratamientos elaborados a partir de *Arachis* y *Cratylia* presentaron valores intermedios ( $14,0 \pm 1,9$  –  $13,9 \pm 1,9$  L CH<sub>4</sub>/kg de MSD), aunque no hubo diferencias entre ellos. Los valores de producción de metano para cada especie de leguminosa son mayores a los reportados en el trabajo de Meale et al., (2012) para *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis* y *Gliricidia sepium* ( $7,3$  –  $11,1$  L CH<sub>4</sub>/kg de MSD). Todos los tratamientos presentaron valores mayores a los obtenidos en el trabajo de Arce-Cordero et al., (2014) ( $6,57$  –  $8,45$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible). Estas diferencias pueden ser debidas a la especie forrajera, al contenido de metabolitos secundarios y manejo del cultivo.

Cuadro 2. Producción de metano, concentración y proporción de los ácidos grasos volátiles de diferentes mezclas forrajeras a 24 horas de fermentación in vitro. San José, Costa Rica. 2016.

Forraje	Leguminosa	CHO	CH4 (L/kg MS)	CH4 (L/kg MSD)	Ácidos grasos volátiles (moles/100 moles de AGV)					
					Acético (A)	Propiónico (P)	Butírico	Otros ácidos	Relación A:P	
Fresco	Vigna	Melaza	11,03 <sup>d</sup>	16,85 <sup>d</sup>	62,97 <sup>b</sup>	20,77 <sup>b</sup>	9,83	5,73	3,07 <sup>c</sup>	
		PCD	11,45 <sup>d</sup>	17,60 <sup>d</sup>	64,40 <sup>c</sup>	18,83 <sup>a</sup>	11,17	5,50	3,43 <sup>d</sup>	
		Maíz	10,12 <sup>d</sup>	15,80 <sup>c</sup>	61,43 <sup>a</sup>	24,13 <sup>d</sup>	8,93	5,17	2,56 <sup>a</sup>	
		Guineo	11,75 <sup>d</sup>	18,72 <sup>e</sup>	64,20 <sup>c</sup>	20,57 <sup>b</sup>	10,01	6,43	3,08 <sup>c</sup>	
	Arachis	Melaza	9,65 <sup>c</sup>	14,11 <sup>c</sup>	62,60 <sup>b</sup>	21,60 <sup>b</sup>	9,47	6,33	2,90 <sup>c</sup>	
		PCD	10,03 <sup>c</sup>	15,44 <sup>c</sup>	64,27 <sup>c</sup>	20,30 <sup>a</sup>	10,70	4,73	3,17 <sup>c</sup>	
		Maíz	8,60 <sup>c</sup>	12,36 <sup>b</sup>	60,77 <sup>a</sup>	24,60 <sup>d</sup>	8,60	6,03	2,47 <sup>a</sup>	
		Guineo	11,20 <sup>d</sup>	16,99 <sup>d</sup>	63,77 <sup>c</sup>	21,27 <sup>b</sup>	9,50	5,44	3,00 <sup>c</sup>	
	Cratylia	Melaza	8,76 <sup>c</sup>	12,49 <sup>b</sup>	62,03 <sup>a</sup>	21,63 <sup>b</sup>	10,17	6,17	2,87 <sup>c</sup>	
		PCD	10,80 <sup>d</sup>	15,99 <sup>c</sup>	64,03 <sup>c</sup>	19,80 <sup>a</sup>	10,90	5,27	3,24 <sup>d</sup>	
		Maíz	8,02 <sup>b</sup>	14,55 <sup>c</sup>	61,53 <sup>a</sup>	24,27 <sup>d</sup>	8,67	5,54	2,54 <sup>a</sup>	
		Guineo	11,13 <sup>d</sup>	16,81 <sup>d</sup>	61,30 <sup>a</sup>	21,03 <sup>b</sup>	11,01	6,67	2,92 <sup>c</sup>	
	Erythina	Melaza	8,11 <sup>b</sup>	12,64 <sup>b</sup>	63,67 <sup>c</sup>	20,17 <sup>a</sup>	8,97	7,90	3,12 <sup>c</sup>	
		PCD	9,31 <sup>c</sup>	14,19 <sup>c</sup>	64,50 <sup>c</sup>	19,57 <sup>a</sup>	11,27	4,77	3,30 <sup>d</sup>	
		Maíz	7,51 <sup>b</sup>	12,02 <sup>a</sup>	61,77 <sup>a</sup>	24,70 <sup>d</sup>	8,53	5,33	2,49 <sup>a</sup>	
		Guineo	9,11 <sup>c</sup>	14,41 <sup>c</sup>	63,01 <sup>b</sup>	20,97 <sup>b</sup>	9,50	5,34	3,07 <sup>c</sup>	
	Ensilado	Vigna	Melaza	9,79 <sup>c</sup>	14,75 <sup>c</sup>	62,83 <sup>b</sup>	21,83 <sup>b</sup>	10,40	5,33	2,86 <sup>c</sup>
			PCD	10,06 <sup>c</sup>	15,51 <sup>c</sup>	62,53 <sup>b</sup>	20,63 <sup>b</sup>	11,70	5,60	3,01 <sup>c</sup>
			Maíz	9,24 <sup>c</sup>	13,68 <sup>b</sup>	61,28 <sup>a</sup>	24,70 <sup>d</sup>	9,53	4,85	2,46 <sup>a</sup>
			Guineo	11,08 <sup>d</sup>	16,76 <sup>d</sup>	63,43 <sup>c</sup>	22,77 <sup>c</sup>	11,23	5,20	2,67 <sup>b</sup>
Arachis		Melaza	9,02 <sup>c</sup>	12,86 <sup>b</sup>	60,95 <sup>a</sup>	24,23 <sup>d</sup>	9,05	5,80	2,52 <sup>a</sup>	
		PCD	9,34 <sup>c</sup>	14,62 <sup>c</sup>	63,10 <sup>b</sup>	21,45 <sup>b</sup>	10,63	4,93	2,95 <sup>c</sup>	
		Maíz	7,51 <sup>b</sup>	10,89 <sup>a</sup>	60,23 <sup>a</sup>	24,63 <sup>d</sup>	9,63	5,53	2,42 <sup>a</sup>	
		Guineo	8,95 <sup>c</sup>	14,52 <sup>c</sup>	62,53 <sup>a</sup>	22,95 <sup>c</sup>	8,25	6,58	2,71 <sup>b</sup>	
Cratylia		Melaza	9,35 <sup>b</sup>	13,28 <sup>b</sup>	60,70 <sup>a</sup>	22,85 <sup>c</sup>	9,80	6,65	2,66 <sup>b</sup>	
		PCD	8,12 <sup>b</sup>	11,73 <sup>a</sup>	61,98 <sup>a</sup>	21,40 <sup>b</sup>	10,63	6,01	2,90 <sup>c</sup>	
		Maíz	10,56 <sup>d</sup>	11,56 <sup>a</sup>	60,58 <sup>a</sup>	25,15 <sup>d</sup>	8,63	5,65	2,41 <sup>a</sup>	
		Guineo	10,01 <sup>c</sup>	15,05 <sup>c</sup>	60,80 <sup>a</sup>	23,05 <sup>c</sup>	10,30	5,85	2,64 <sup>b</sup>	
Erythina		Melaza	7,61 <sup>b</sup>	11,38 <sup>a</sup>	62,45 <sup>b</sup>	21,68 <sup>b</sup>	9,88	5,63	2,91 <sup>c</sup>	
		PCD	8,27 <sup>b</sup>	12,89 <sup>b</sup>	62,08 <sup>a</sup>	20,83 <sup>b</sup>	12,58	4,08	3,00 <sup>c</sup>	
		Maíz	6,76 <sup>a</sup>	10,24 <sup>a</sup>	60,93 <sup>a</sup>	24,78 <sup>d</sup>	8,65	4,85	2,48 <sup>a</sup>	
		Guineo	8,01 <sup>b</sup>	12,75 <sup>b</sup>	60,80 <sup>a</sup>	21,73 <sup>b</sup>	10,43	4,43	2,92 <sup>c</sup>	
E.E.			0,41	0,48	0,30	0,36	0,54	0,61	0,05	

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (p<0,05) MS= Materia seca MSD= Materia seca digestible EE=error estándar

Los tratamientos elaborados con *Cratylia* y con *Erythrina* fueron los que presentaron mayor contenido de fibra en detergente neutro indigestible, por lo tanto, poseen menor contenido de fibra aprovechable por el rumiante, lo que reduce el valor del forraje (Detmann et al., 2004), y en consecuencia habría menor producción de metano. Sin embargo, al correlacionar el contenido de fibra detergente neutro indigestible con la producción del gas se obtuvo una correlación ( $\rho=-0,51$ ), por lo que no se considera apropiado el uso de este parámetro como posible indicador de metanogénesis. Ello contradice lo reportado por Kasuya y Takahashi (2010) quienes mostraron que la digestibilidad de la fibra es un buen indicador para estimar la producción de metano en forrajes, aunque ese trabajo se realizó con forrajes de clima templado, lo que sugiere que existe un factor adicional al contenido de fibra indigestible que reduce la producción del gas, por ejemplo la concentración de taninos condensados en el forraje.

De esta manera, por medio de un metanálisis de investigaciones previas se determinó que en promedio la leguminosas de los géneros *Erythrina* y *Arachis* poseen mayor concentración de taninos condensados con respecto a las otras especies de leguminosas (Cuadro 3), aunque fueron los tratamientos elaborados a partir de *Erythrina* los que presentaron menor producción de metano (Figura 1), lo que coincide con lo publicado en las investigaciones de Puchala et al., (2005); Tan et al., (2011); Archiméde et al., (2011) y Molina-Botero et al., (2013) quienes indican que las leguminosas tropicales tienen capacidad para reducir la producción de metano debido a su contenido de taninos condensados y que es posible el mismo efecto se repita en ensayos *in vitro*.

En el caso de los tratamientos con *Arachis*, se determinó que el promedio de concentración de taninos es igual al de *Erythrina* (Cuadro 3). Sin embargo, la producción de metano es semejante a la de los tratamientos de *Cratylia* (Figura 1). Esta situación puede ser provocada por mayor contenido de fibra en detergente neutro digestible en los tratamientos de *Arachis* lo que aumenta el aprovechamiento por parte del rumiante, que a su vez incrementa la cantidad de materia orgánica fermentándose en el rumen (Raffrenato y Erasmus, 2013) y que en consecuencia aumenta la producción de metano (Dijkstra et al., 2011). De la misma manera, los tratamientos elaborados con *Vigna* fueron los que presentaron mayor producción de metano *in vitro* (Figura 1), esto debido a que posee menor contenido de fibra en detergente neutro indigestible ( $14,95\pm 3,5\%$  FDN) y es el forraje que posee menor contenido de taninos condensados junto con la *Cratylia* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultado del meta-analisis para estimar la concentración de taninos condensados en las leguminosas forrajeras analizadas. San José, Costa Rica. 2016.

Leguminosa	T.C. (% MS)	N	D.E.	Mínimo (% MS)	Máximo (% MS)	Referencias
Vigna	0,24 <sup>a</sup>	7	0,5	0,001	1,35	Pootaeng-on et al.2015; Bernal et al. 2008a; Bernal et al. 2008b; Baloyi et al. 2001; Tiemann et al. 2008; Stürm et al. 2007; Heinritz et al. 2012.
Arachis	2,64 <sup>b</sup>	6	1,8	0,82	5,43	Delgado et al. 2010; Lascano 1994; Jackson et al. 1996; Abdalla et al. 2012; Khamseekhiew et al. 2000; López et al. 2004
Cratylia	1,09 <sup>a</sup>	6	2,5	0,001	6,70	Bernal et al. 2008a; Heinritz et al. 2012; Kexian et al. 1998; Tiemann et al. 2008; Dos Santos 2007; Stürm et al. 2007
Erythrina	3,35 <sup>b</sup>	5	2,4	0,55	5,10	Kongmanila et al. 2007; Pugalenthil et al. 2004; Kongmanila et al. 2012; Kongmanila y Ledin 2009; López et al. 2004

TC=Taninos condensados, MS= materia seca, D.E= Desviación estándar  
Diferentes letras en la misma columna son diferentes (p<0,05)

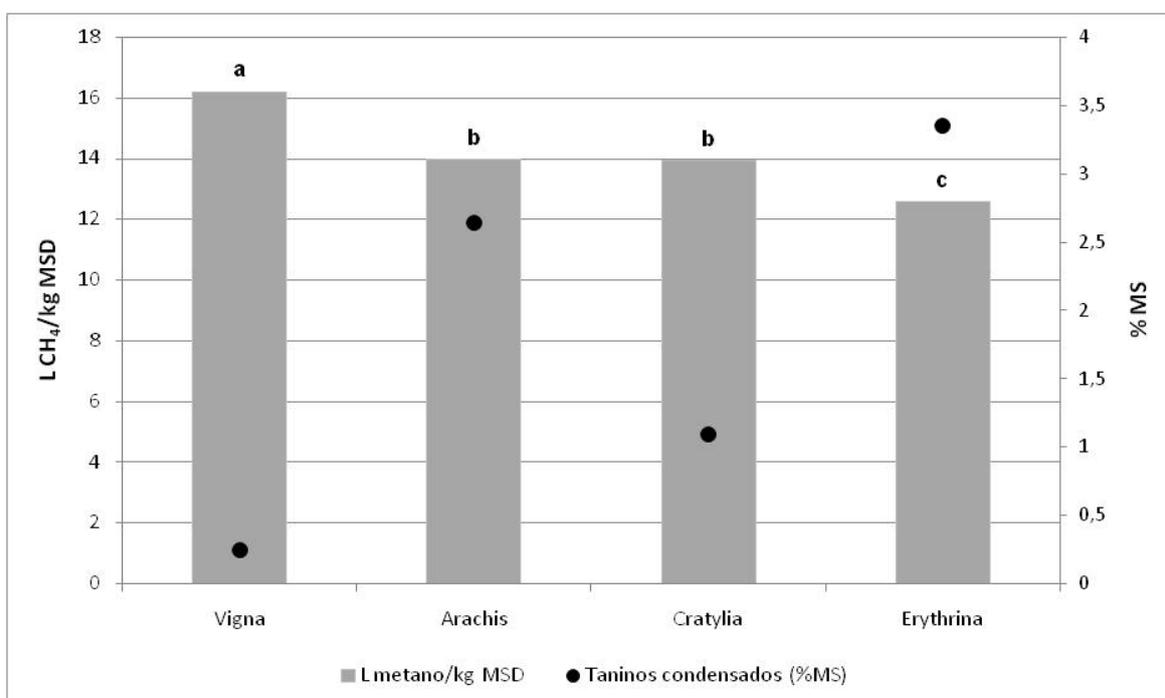


Figura 1. Comparación entre la producción in vitro de metano y el contenido de taninos condensados\* de las leguminosas forrajeras evaluadas. San José, Costa Rica. 2016.

\*Resultado del meta-análisis

El uso de plantas con altos contenidos de taninos para reducir la producción de metano está documentada en varias investigaciones (Waghorn et al., 2002; Puchala et al., 2005 y Archimède et al., 2015). En el trabajo de Grainger et al., (2009) se determinó que al incrementar la cantidad de forraje alto en taninos (*Acacia mearnsii*) se puede reducir la producción de metano en 114,3 L metano/día. En la presente investigación se detectó que la diferencia entre los promedios de los tratamientos elaborados con Erythrina y los elaborados con Vigna fue de 86,1 L metano/día. Esta diferencia se estimó a partir del consumo de alimento en materia seca de un animal con peso promedio de 500 kg mediante la ecuación descrita en el trabajo de Belyea et al., (1996) que utiliza el contenido de FDN promedio de cada leguminosa.

Al analizar el efecto de la fuente de carbohidratos, se determinó que los tratamientos donde se agregó maíz fueron los que presentaron menores producciones de metano, ya que produjeron  $12,6 \pm 1,9$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible. Esto coincide con lo reportado en diversos trabajos (Duncan, 2014; Hindrichsen et al., 2005) quienes afirman que utilizar almidones en dietas de rumiantes permite reducir la producción de metano. Sin embargo, los tratamientos con incorporación de fruto de guineo cuadrado fueron los que presentaron mayor emisión ( $15,8 \pm 2,0$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible) a pesar de ser una fuente rica en almidón ( $\pm 52\%$  MS) de acuerdo a lo reportado por López-Herrera et al., (2015). Los tratamientos en los que se utilizó melaza y pulpa de cítricos deshidratada presentaron valores intermedios ( $13,4 \pm 1,7$  y  $14,7 \pm 1,8$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible, respectivamente). El efecto de cada forraje, de acuerdo a la fuente de carbohidratos para los tratamientos ensilados, puede ser observado en la Figura 2.

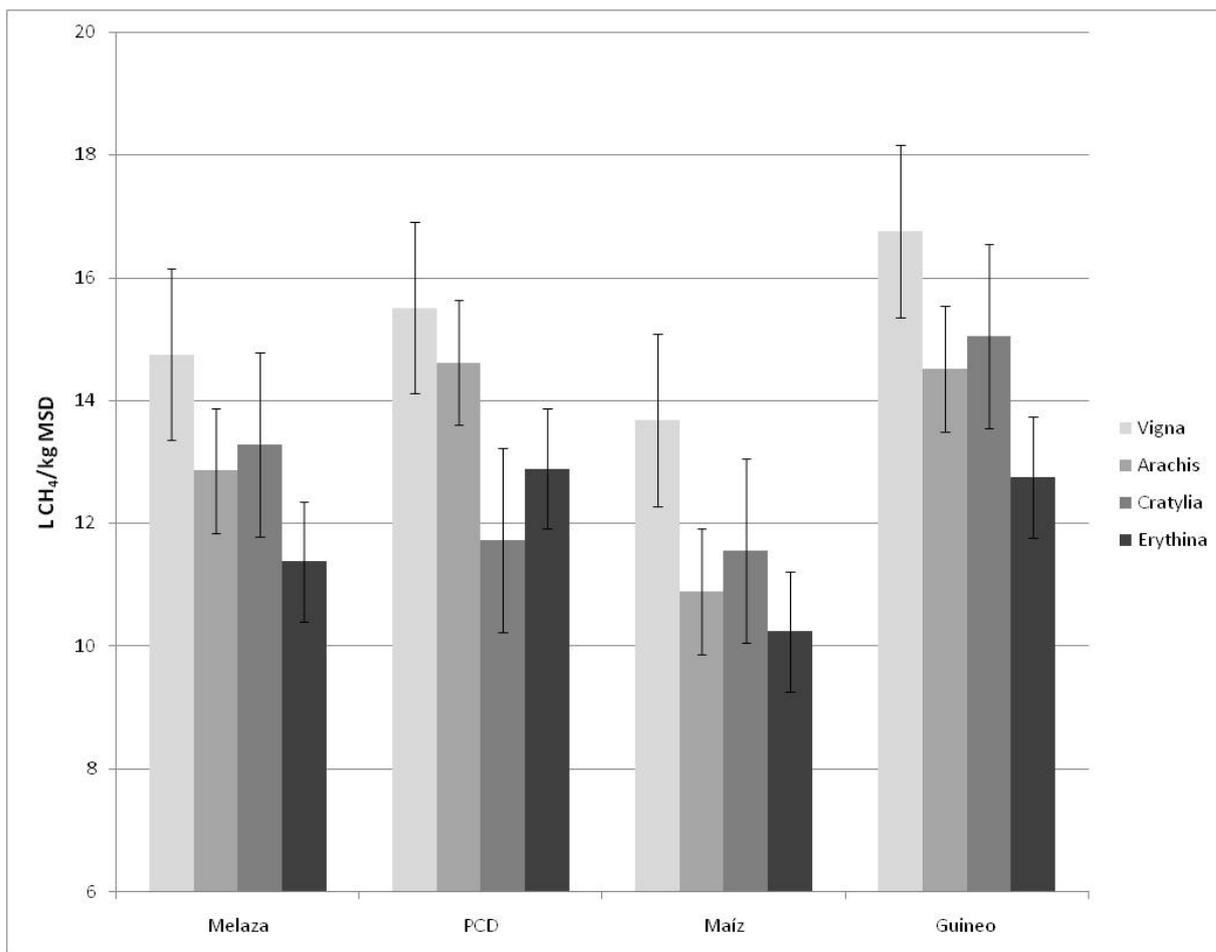


Figura 2. Producción de metano de las mezclas forrajeras ensiladas, con 24 horas de fermentación in vitro. Barras: error estándar San José, Costa Rica. 2016.

La reducción promedio en la producción de metano provocada por el maíz coincide con lo indicado en los trabajos de Duncan (2014) y Archimède et al., (2011), quienes señalan que es posible reducir la producción de metano cuando se aumenta el uso de fuentes con mayor contenido de carbohidratos no estructurales, como los almidones. Aunque no ocurre lo mismo con los tratamientos en los que se utilizó fruto inmaduro de guineo cuadrado, donde en promedio se obtuvo la mayor producción de metano. De acuerdo a Pelissari et al., (2012) el almidón es el componente principal de los guineos inmaduros, por lo tanto, debió ocurrir reducción en la producción de metano, tal y como sucedió con los tratamientos donde se incorporó el maíz. Sin embargo, esto no ocurre, lo que sugiere que existe algún grado de resistencia del almidón del fruto a la degradación por parte de los microorganismos.

En esta investigación no fue posible cuantificar la resistencia del almidón presente en los tratamientos con fruto de guineo cuadrado, sin embargo, se pueden

realizar algunas afirmaciones basadas en otras investigaciones. Por ejemplo, Ravi y Mustaffa (2013) señalan que los frutos de musáceas pueden contener hasta 85% de almidón y de este alrededor del 57% puede ser resistente a la degradación, por su parte Lehmann et al., (2002) y Bello-Lara et al., (2014) indican que en las musáceas existe una proporción considerable de almidón resistente a la degradación. Además, Sagilata et al., (2006) reportan que la resistencia del almidón está relacionada con el contenido de amilosa, es decir que a mayor concentración de amilosa en el almidón, mayor será el contenido de almidón resistente. Sin embargo, la concentración de amilosa en los frutos puede variar entre variedades (Mota et al., 2000; Dufour et al., 2009), por lo tanto, se debe realizar más investigación en lo que respecta a la concentración de este tipo de almidón en el fruto de guineo cuadrado inmaduro.

Es posible explicar que hubo poca participación del fruto de guineo cuadrado en el proceso de incubación del licor ruminal, ya que al analizar los tratamientos donde se utilizó el fruto la concentración de propionato fue de  $21,9 \pm 1,2$  mol/100 moles de AGV, semejante a la media obtenida en los tratamientos con melaza ( $21,9 \pm 1,3$  mol/100 moles de) AGV aunque diferente a la obtenida en los tratamientos donde se utilizó pulpa de cítricos deshidratada ( $20,5 \pm 1,1$  mol/100 moles de AGV). A pesar de ser una fuente alta en almidón ( $\pm 52\%$  MS) de acuerdo a lo publicado por López-Herrera et al., (2015) no presentó valores similares a los obtenidos en los tratamientos elaborados con maíz ( $24,7 \pm 0,65$  mol/100 moles de AGV); estos últimos presentaron la mayor concentración de propionato (Figura 3). Esto sugiere que el almidón del fruto no participa del proceso de fermentación durante la incubación en licor ruminal, ya que el almidón aumenta la concentración del propionato durante la fermentación ruminal (Huntington et al., 2006).

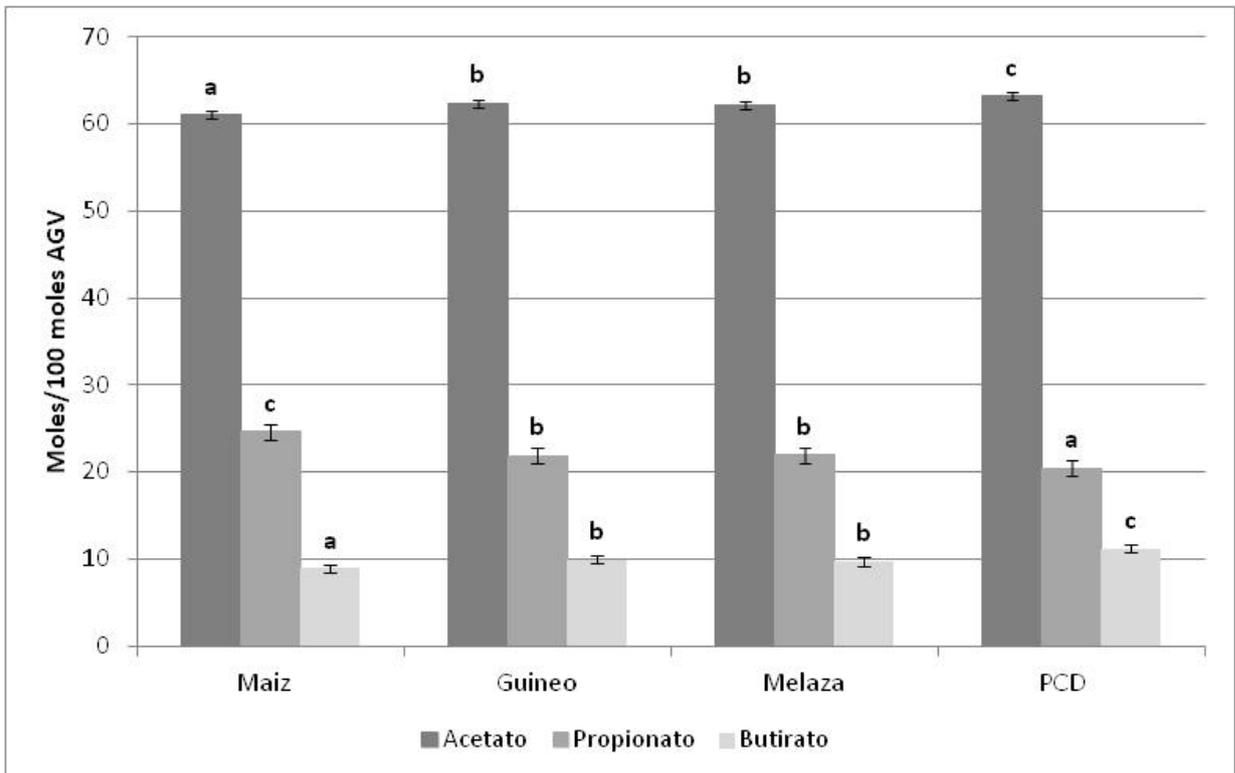


Figura 3. Concentración de ácidos grasos volátiles en el licor ruminal con 24 horas de fermentación *in vitro*, de acuerdo a la fuente de carbohidratos. San José, Costa Rica. 2016. Letras diferentes en el mismo color de columna son diferentes  $p < 0,05$

En contraste con lo anterior, la concentración de acetato en los tratamientos donde se utilizó pulpa de cítricos deshidratada fue el mayor ( $63,4 \pm 1,2$  mol/100 moles de AGV), esto debido a que la pulpa de cítricos deshidratada posee entre 22 y 40% de pectinas (Kim et al., 2007), las cuales son consideradas fibras fermentables (Mansfield y Stern, 1994; Kohestani et al., 2011) y como tales aumentan la concentración de acetato en el rumen (Álvarez et al., 2009). Además, los tratamientos con pulpa de cítricos deshidratada presentaron la mayor concentración de butirato ( $11,2 \pm 1,2$  mol/100 moles de AGV) tal y como se puede observar en la Figura 3.

En el caso de los tratamientos elaborados con grano de maíz molido, se obtuvo la menor concentración de acetato ( $61,0 \pm 0,7$  mol/100 moles de AGV) comparado con los tratamientos con fruto inmaduro de guineo cuadrado ( $62,4 \pm 1,4$  mol/100 moles de AGV). El almidón en el fruto no es degradado por los microorganismos en el licor ruminal, en consecuencia los únicos carbohidratos disponibles son la hemicelulosa y la celulosa fuentes que de acuerdo con Archimède et al., (2011) incrementan la producción de metano. Por esta razón, los tratamientos elaborados con pulpa de cítricos deshidratada y fruto inmaduro de guineo cuadrado fueron los que presentaron

las mayores producciones de metano ( $14,7 \pm 1,8$  y  $15,5 \pm 2,0$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible, respectivamente). En la presente investigación se determinó que la diferencia en la producción de metano *in vitro* entre los tratamientos donde se utilizó pulpa de cítricos deshidratada y los de maíz fue de 17%, lo que coincide con lo reportado por Czerkawski y Breckenridge (1969) y Hindrichsen et al., (2004).

Con respecto al efecto del ensilaje, se determinó que los materiales ensilados producen ( $p < 0,05$ )  $13,7 \pm$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible, mientras que los materiales frescos  $14,9 \pm$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca digestible. Las diferencias obtenidas se deben a la reducción de la hemicelulosa (26,1%) y de la celulosa (5,64%) durante el ensilaje, esto provocó reducción en el contenido de fibra del material y aumento en la digestibilidad lo que permitió la reducción en la producción de metano. El mismo efecto fue detectado en el trabajo de Navarro-Villa et al. (2013), quienes compararon las diferencias en producción de gas metano entre ensilajes y materiales frescos de pastos y leguminosas.

Esta disminución en la concentración de los componentes de la fibra también influye en la concentración de los ácidos grasos volátiles (Jiao et al., 2013). De esta manera, los tratamientos ensilados tienen menor ( $p < 0,05$ ) producción de acetato ( $61,7 \pm 1,1$  mol/100 moles de AGV), en comparación con los tratamientos en fresco ( $62,9 \pm 1,4$  mol/100 moles de AGV), lo que coincide con los resultados obtenidos en el trabajo de Boadi et al., (2004), quienes reportan disminución del 33% en la producción de metano al utilizar materiales ensilados. Sin embargo, en la presente investigación la reducción de metano fue 9,5%, al pasar de fresco a ensilado, esto debido a que el valor de reducción proviene de un promedio que involucra cuatro especies de leguminosas y cuatro tipos de carbohidratos, lo que agrega mucha variación a los promedios de cada forma de procesamiento del forraje.

#### *Estimación de la emisión de metano entérico*

Se calculó  $9,4 \pm 1,5$  L CH<sub>4</sub>/kg de materia seca como promedio de producción de metano de todos los tratamientos analizados y con esto se procedió a simular la emisión de metano entérico. No se determinaron diferencias ( $p > 0,05$ ) en la producción de metano entérico entre las vacas pesadas y las livianas, esto se debe a los consumos de materia seca de las vacas livianas de mayor producción de leche, ya que es similar al consumo de materia seca de las vacas pesadas de menor producción promedio. Esto concuerda con lo publicado por Bernier (2011), quienes señalan que el

consumo afecta la producción del metano en el rumen. Por otra parte, se detectaron diferencias en cuanto al nivel productivo de los animales, de esta manera, los animales más productivos y que consumieron más alimento (Cuadro 3) fueron los que produjeron más metano. Esto coincide con lo reportado por Dijkstra et al., (2011), quienes señalan que la producción de metano depende de la cantidad de biomasa degradada, ya que hay mayor actividad microbiana en el rumen.

Cuadro 3. Emisión de metano entérico simulada a partir del promedio de producción de metano de las mezclas de leguminosas y fuentes de carbohidratos evaluadas, de acuerdo al nivel de producción y al peso de los animales. San José, Costa Rica. 2016.

Peso vivo (Kg)	Nivel productivo (kg leche/vaca/día)	CMS*	L CH <sub>4</sub> día	E.E.	Intervalos de confianza	
					LI	LS
454	10	12,4	83.8,4 <sup>a</sup>	2,89	110,45	122,25
	30	19,5	182,9 <sup>b</sup>	4,55	173,70	192,24
680	25	19,6	197,9 <sup>b</sup>	4,92	187,95	208,02
	45	25,7	263,7 <sup>c</sup>	6,55	250,30	277,03

\* CMS= Consumo de materia seca, E.E.= Error estándar LI= Límite inferior, LS=Límite superior

Diferentes letras en la misma columna son diferentes (p<0,05)

Los valores de producción de metano estimados en esta investigación, coinciden con los reportados en otras investigaciones, como la de Nascimento (2007) (183,3 – 191,6 L CH<sub>4</sub>/día) quien utilizó heno de *Brachiaria brizantha* con diferentes estados de maduración y alimento balanceado. Aunque son menores a los reportados por Canesin et al., (2014) 313,8 – 351,4 L CH<sub>4</sub>/día para animales de leche que pastorean apartos de *Brachiaria brizantha*. Estas diferencias se deben a diferencias entre especies forrajeras, manejo agronómico, edad del rebrote, procesamiento del alimento y localización geográfica (Pedreira et al. 2009; Hook et al., 2010; Archimède et al., 2011).

## 6.6. CONCLUSIONES

Se determinaron diferencias en el contenido de fibra en detergente neutro indigestible, donde las leguminosas arbustivas presentaron mayor concentración de esta variable comparados con las leguminosas herbáceas. En lo que respecta a la fuente de carbohidratos, los tratamientos en los que se utilizó el fruto inmaduro de guineo cuadrado fueron los que presentaron mayor contenido de fibra en detergente neutro indigestible, debido a una mayor concentración de este componente de la pared celular en el fruto.

Se obtuvo que la especie de leguminosa, la fuente de carbohidratos y el ensilaje, generan diferencias en la producción de metano. Las diferencias por especie de leguminosa, provienen de mayor contenido de fibra en detergente neutro digestible y la concentración de taninos condensados en el forraje. De esta manera la leguminosa *Vigna unguiculata* fue la leguminosa que produjo más metano y la *Erythrina poeppigiana* fue la de menor producción de este gas.

En cuanto a la fuente de carbohidratos, se determinó que los tratamientos donde se agregó maíz fueron los que presentaron menores producciones de metano, mientras que los tratamientos donde se incorporó fruto de guineo cuadrado fueron los que presentaron mayor emisión, se considera que existe resistencia a la degradación por parte del almidón de manera que los carbohidratos disponibles en estas mezclas fueron los de la pared celular de las leguminosas, lo que aumentó la producción de metano.

La concentración de acetato en los tratamientos donde se utilizó pulpa de cítricos deshidratada fue mayor, esto debido a su contenido de pectinas consideradas fibras fermentables. En los tratamientos con guineo cuadrado los microorganismos del licor ruminal utilizaron los carbohidratos de la fibra como fuente de energía, debido a posible resistencia a la degradación del almidón en el fruto, lo que incrementó la concentración de acetato. Mientras que los tratamientos con maíz fueron los que presentaron menor concentración de acetato en licor ruminal.

En el caso del ensilaje se obtuvo reducción promedio de 9,5% al pasar de fresco a ensilado, esto es debido a un menor contenido de fibra en el ensilado con respecto al material fresco. En la simulación de la emisión de metano entérico fue posible detectar diferencias en cuanto al nivel productivo de los animales, de esta manera los animales más productivos y que consumieron más alimento produjeron más metano.

## 6.7. LITERATURA CITADA

- Abdalla, A.L., Louvandini, H., Sallam, S.M.A.H., da Silva Bueno, I.C., Tsai, S.M., de Oliveira Figueira, A.V. 2012. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. *Tropical Animal Health and Production* 44(5): 953-964.
- Adams, R.S., Comerford, J.W., Ford, S.A., Graves, R.E., Heald, C.W., Heinrichs, A.J., Henning, W.R., Hutchinson, L.J., Ishler, V.A., Keyser, R.B., O`connor, M.L., Specht, L.W., Spencer, S.B., Varga, G.A., Yonkers, R.D. (1995). Dairy Reference Manual. Third edition. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Pennsylvania State University. United States. 108 p.
- Alvarez, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Herrera, J.G., García, J.C., Gonzalez, S.S., Barcena, R. 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. *Livestock Science* 121(2): 150-154.
- Arce-Cordero J., Campos-Granados C.M., Rojas-Bourrillon A., Villalobos-Villalobos L. 2014. Producción de gas in vitro y metano entérico de los principales forrajes utilizados en fincas comerciales de Costa Rica. Informe final de proyecto de investigación. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 5p.
- Archimède H., Eugène M., Marie Magdeleine C., Boval M., Martin C., Morgavi D.P., Lecomte P., Doreau M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167: 59– 64
- Archimède, H., Rira, M., Barde, D.J., Labirin, F., Marie-Magdeleine, C., Calif, B., Periacarpin, F., Fleury, J., Rochette, Y., Morgavi, P., Doreau, M. 2015. Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* DOI: 10.1111/jpn.12423.
- Arthington, J.D., Brown, W.F. 2005. Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *Journal of Animal Science* 83(7): 1726 – 1731.
- Baloyi, J.J., Ngongoni, N.T., Topps, J.H., Acamovic, T., Hamudikuwanda, H. 2001. Condensed tannin and saponin content of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, *Desmodium uncinatum*, *Stylosanthes guianensis* and *Stylosanthes scabra* grown in Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production* 33(1): 57-66.
- Bello-Lara, J.E., Balois-Morales, R., Sumaya-Martínez, M.T., Juárez-López, P., Rodríguez-Hernández, A.I., Sánchez-Herrera, L.M., Jiménez-Ruiz, E.I. 2014. Extracción y caracterización reológica de almidón y pectina en frutos de plátano 'Pera' (Musa ABB). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1501 – 1507.

- Belyea, R., B. Steevens, G. Garner, J. Whittier y H. Sewell 1996. Using NDF and ADF to balance diets. University of Missouri Extension Leaflet G3161. University of Missouri Extension, Columbia MO.
- Bernal, L., Ávila, P., Ramírez, G., Lascano, C. 2008a. Efecto de la Suplementación con heno de *Calliandra calothyrsus* y *Vigna unguiculata* sobre la producción de leche en bovinos en Colombia. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 16(3): 94-109
- Bernal, L., Ávila, P., Ramírez, G., Lascano, C.E., Tiemann, T., Hess, H. 2008b. Efecto del ensilaje y el heno de *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* sobre la producción de gas in vitro. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 16(3): 97-103.
- Bernier J.N. 2011. Impact of cold acclimatization on nutrient utilization and enteric methane emissions of beef cows overwintered on low-quality forage diets supplemented with dried distillers grain with soluble. Tesis doctoral. Universidad de Manitoba, Winnipeg, Canadá. 225p.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J. and Massé, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows. Canadian Journal of Animal Science. 84: 319–335.
- Buddle B.M., Denis M., Attwood G.T., Altermann E., Janssen P.H., Ronimus R.S., Pinares-Patiño C.S., Muetzel S., Wedlock D.N. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. The Veterinary Journal. 188 (2011) 11–17
- Campabadal C. 1999. Factores que afectan el contenido de sólidos de la leche. Revista Nutrición Animal Tropical 5(1): 67-92.
- Canesin, R. C., Berchielli, T. T., Messana, J. D., Baldi, F., Pires, A. V., Frighetto, R. T. S., Fiorentini G., Reis R. A. (2014). Effects of supplementation frequency on the ruminal fermentation and enteric methane production of beef cattle grazing in tropical pastures. Revista Brasileira de Zootecnia, 43(11), 590-600.
- Chandler, J.A. 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. M.S. thesis. Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Cruz M., Sánchez J. 2000. La fibra en la alimentación del ganado lechero. Revista Nutrición Animal Tropical 6(1): 39-74.
- Czerkawski, J. W. and Breckenridge, G. 1969. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. Brazilian Journal of Nutrition 23: 925 – 937.
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., Savón, L., Scull, I., González, N., Marrero, Y. 2010. Potential of tropical plants to exert defaunating effects on the rumen and to

- reduce methane production. In: Odongo N.E., Garcia M., Viljoen G.J. Sustainable Improvement of Animal Production and Health. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy 49-54.
- Detmann E., J.T. Zervoudakis, L.D.S. Cabral, V.R. Rocha Júnior, S.D.C. Valadares Filho, A.C.D. Queiroz, N.J. Ponciano y A.M. Fernandes. 2004. Validação de equações preditivas da fração indigestível da fibra em detergente neutro em gramíneas tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33(6): 1866 – 1875.
- Di Rienzo J A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo Y.C. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dijkstra J., Oenema O., Bannink A. 2011. Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3: 414–422
- Dos Santos, N.D.F.A 2007. Valor nutritivo de *Cratylia argentea* para suplementação de ruminantes na Amazônia. Tesis de Maestría. Universidade Federal do Pará. Brasil. 68p.
- Dufour, D., Gibert, O., Giraldo, A., Sánchez, T., Reynes, M., Pain, J.P., González, A., Fernández, A., Díaz, A. 2009. Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 2. Thermal and functional characterization of cultivated colombian Musaceae (*Musa* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(17): 7870 – 7876.
- Duncan A.V.M. 2014. Reduction of Enteric Methane Production: A Nutritional Approach. Tesis doctoral. Universidad de Carolina del Norte A&T en Greensboro. Estados Unidos. 123p
- Emaga, T.H., Robert, C., Ronkart, S.N., Wathelet, B., Paquot, M. 2008. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresource Technology* 99(10): 4346 – 4354.
- Firkins J.L. 1997. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, 80(7): 1426-1437.
- Flores O.I., Bolivar D.M., Botero J.A., Ibrahim, M.A. 1998. Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial forrajero para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, 10(1): 1-10.
- Grainger C., Beauchemin K.A. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167 (2011) 308– 320.

- Grainger, C., Clarke, T., Auld, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C. and Eckard, R.J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 89: 241-251.
- Heinritz, S.N., Martens, S.D., Avila, P., Hoedtke, S. 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology* 174(3): 201-210.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Diaz, T.E., 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. *Crop and Pasture Science* 54(7): 703-713.
- Hindrichsen I.K., Wettstein H.R., Machmuller A., Jorg B., Kreuzer M. 2005. Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environmental Monitoring and Assessment* 107: 329–350
- Hindrichsen, I. K., Wettstein, H.-R., Machmüller, A., Soliva, C. R., Bach Knudsen, K. E., Madsen, J. and Kreuzer, M. 2004. Effect of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release in vitro. *Journal of Animal Science*. 84: 265–276.
- Hiriart M. 2008. *Ensilados. Procesamiento y Calidad*. Editorial Trillas. 2da edición. México. 110p.
- Huntington, G.B., Harmon, D.L., Richards, C.J. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *Journal of Animal Science* 84(13\_suppl): E14-E24.
- Jackson, F.S., Barry, T.N., Lascano, C., Palmer, B. 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71(1): 103-110.
- Jančík, F., Homolka, P., Čermák, B., Lád, F. 2008. Determination of indigestible neutral detergent fibre contents of grasses and its prediction from chemical composition. *Czech Journal of Animal Science* 53(3): 128 – 135
- Jiao H.P., Yan T., McDowell D.A., Carson A.F., Ferris C.P., Eason D.L., Wills D. 2013. Enteric methane emissions and efficiency of use of energy in Holstein heifers and steers at age of six months. *Journal of Animal Science*. 91:356–362
- Kasuya H., Takahashi J., 2010. Methane Emissions from Dry Cows Fed Grass or Legume Silage. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 23(5): 563 – 566.
- Kexian, Y., Lascano, C.E., Kerridge, P.C., Avila, P. The effect of three tropical shrub legumes on intake rate and acceptability. *Pasturas tropicales* 20(3): 31-35

- Khamseekhiew, B., Liang, J. B., Wong, C. C., Jalan, Z. A. (2001). Ruminal and intestinal digestibility of some tropical legume forages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14(3): 321-325.
- Kim, S.C., Adesogan, A.T., Arthington, J.D. 2007. Optimizing nitrogen utilization in growing steers fed forage diets supplemented with dried citrus pulp. *Journal of Animal Science* 85(10): 2548-2555.
- Kohestani, M.G., Yansari, A.T., & Rezaei, M. 2011. Effects of partial replacement of barley with sugar beet pulp on pre-and post-partum performance of Zel ewes. *South African Journal of Animal Science* 41(3): 256-264.
- Kongmanila D, Bertilsson J, Ledin I., Wredle E. 2012. Utilisation of some *Erythrina* species and biomass production of *Erythrina variegata*. *Livestock Research for Rural Development* 24:137. Consultado el 29 de Octubre de 2016 en <http://www.lrrd.org/lrrd24/8/daov24137.htm>
- Kongmanila D., Preston T.R. Ledin I. 2007. Chemical composition, digestibility and intake of some tropical foliage species used for goats. Tesis de maestría MEKARN-Swedish University of Agricultural Sciences. Vietnam. Consultado el 2 de noviembre de 2016 en <http://www.mekarn.org/MS2005-07/theses07/daov1.htm>.
- Kongmanila, D., Ledin, I. 2009. Chemical composition of some tropical foliage species and their intake and digestibility by goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22(6): 803-811.
- Krizsan, S.J., Huhtanen, P. 2013. Effect of diet composition and incubation time on feed indigestible neutral detergent fiber concentration in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96(3): 1715 – 1726.
- Lascano C.E., Cárdenas E. 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*. (supl. especial). 39: 175-182.
- Lascano, C.E. 1994. Nutritive value and animal production of forage *Arachis*. In: Kerridge P.C. and Hardy B. *Biology and agronomy of forage Arachis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical: Cali, Colombia 109-121.
- Lehmann, U., Jacobasch, G., Schmiedl, D. 2002. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18): 5236 – 5240.
- Lopez, J., Tejada, I., Vasquez, C., Garza, J.D.D., Shimada, A. 2004. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their in vitro biological activity: Part 1. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(4): 291-294.
- López-Herrera M., Rojas-Bourrillon A., Zumbado-Ramírez C. 2015. Primer informe parcial proyecto de investigación Evaluación de ensilajes de pastos y forrajeras

- con diferentes niveles de guineo cuadrado (*Musa sp.*) para la alimentación de rumiantes bajo normativa orgánica. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 5p.
- López-Herrera, M., Briceño-Arguedas, E. 2016. Efecto de la frecuencia de corte y la precipitación en el rendimiento de *Cratylia argentea* orgánica. *Nutrición Animal Tropical* 10(1): 24 – 44.
- Mansfield, H.R., Stern, M.D. 1994. Effects of soybean hulls and liginosulfonate-treated soybean meal, on ruminal fermentation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77(4): 1070 – 1083.
- McDonald P. 1981. *The Biochemistry of Silage*. Jonh Wiley & Sons. Ltd. New York. 226 pp.
- Meale, S.J., Chaves, A.V., Baah, J., McAllister, T.A. 2012. Methane production of different forages in in vitro ruminal fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25(1): 86 – 91.
- Mohapatra D., S. Mishra, y N. Sutar. 2010. Banana and its by-product utilization: an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research* 69(5): 323 – 329.
- Molina Botero, I.C., Cantet, J.M., Montoya, S., Correa Londoño, G.A., Barahona Rosales, R. 2013. In vitro methane production from two tropical grasses alone or in combination with *Leucaena leucocephala* or *Gliricidia sepium*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8(2): 15 – 31.
- Moss A.R., Jouany J.P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 49: 231–253
- Mota, R.V., Lajolo, F.M., Cordenunsi, B.R., Ciacco, C. 2000. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. *Starch/Stärke* 52(2-3): 63 – 68.
- Nascimento C.F.M.D. 2007. Emissão de metano por bovinos Nelore ingerindo *Brachiaria brizantha* em diferentes estádios de maturação. Tesis doctoral. Universidad de São Paulo. São Paulo, Brazil. 67 p.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. National Academy Press. Washington DC. 408 p.
- Navarro-Villa, A., O'Brien, M., López, S., Boland, T.M., O'Kiely, P. 2013. In vitro rumen methane output of grasses and grass silages differing in fermentation characteristics using the gas production technique (GPT). *Grass and Forage Science* 68(2): 228 – 244.
- Oba, M., y M.S Allen. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82(3): 589 – 596.

- Pelissari, F.M., Andrade-Mahecha, M.M., Sobral, P.J.D.A., Menegalli, F.C. 2012. Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Starch/Stärke* 64(5): 382 – 391.
- Pootaeng-on, Y., Kimsri, N., Sooksom, S., Tangchaitam, S., Chiangmai, P.N. 2015. Condensed Tannins in Some Tropical Legumes Residue. *Silpakorn University Science and Technology Journal* 9(1):51-60
- Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L., Sahlu, T. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*. 83(1): 182-186.
- Pugalenthi, M., Vadivel, V., Gurumoorthi, P., Janardhanan, K. 2004. Comparative nutritional evaluation of little known legumes, *Tamarindus indica*, *Erythrina indica* and *Sesbania bispinosa*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 4(3): 107-123.
- Raffrenato, E., Erasmus, L.J. 2013. Variability of indigestible NDF in C3 and C4 forages and implications on the resulting feed energy values and potential microbial protein synthesis in dairy cattle. *South African Journal of Animal Science* 43(5): 93 – 97.
- Ravi, I., Mustafa, M.M. 2013. Starch and amylose variability in banana cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology* 18(1): 83 – 87.
- Russell J.B., Rychlik J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292(5519): 1119-1122.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. 2006. Resistant starch—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5(1): 1 – 17.
- Shibata M., Terada F. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal* 81(1): 2 – 10.
- Stürm, C.D., Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Kreuzer, M., Hess, H.D. 2007. Nutrient composition and in vitro ruminal fermentation of tropical legume mixtures with contrasting tannin contents. *Animal Feed Science and Technology* 138(1): 29-46.
- Tan, H.Y., Sieo, C.C., Abdullah, N., Liang, J.B., Huang, X.D., Ho, Y.W. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 169(3): 185 – 193.
- Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Wettstein, H.R., Mayer, A.C., Kreuzer, M., Hess, H.D. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs *Animal* 2(5): 790-799.

- Van Soest, P.V., J.B. Robertson y B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74(10): 3583 – 3597.
- Vargas R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 37pp.
- Waghorn, G.C., Tavendale, M.H., Woodfield, D.R. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 64: 167–171

## **CAPITULO 7. CONCLUSIONES GENERALES**

Los materiales forrajeros analizados presentaron características físicas de calidad media a buena. La calidad de cada tratamiento fue influenciada por el contenido de humedad y la capacidad amortiguadora de cada especie de leguminosa, además el tipo de carbohidrato agregado en la mezcla forrajera, influyó la calidad organoléptica de los ensilados.

Los valores de potencial de hidrógeno y nitrógeno amoniacal presentaron niveles aceptables para ensilados tropicales, sin embargo en los tratamientos en los que se utilizó el guineo cuadrado se encontraron los valores más elevados para estas variables, lo que presume una pérdida de calidad en el forraje conservado. La variación en los valores del potencial de hidrógeno y nitrógeno amoniacal proviene del contenido de humedad en los forrajes y del tipo de carbohidrato agregado, ya que los almidones no participan en el proceso de ensilaje, ya que las amilasas se inactivan en medios ácidos como los que se desarrollan durante el ensilaje.

La concentración de ácidos orgánicos en el ensilado se correlacionó con el potencial de hidrógeno y la concentración de nitrógeno amoniacal, de esta manera, los tratamientos en los que se utilizó melaza presentaron mejores parámetros fermentativos en comparación con los tratamientos en los que se utilizó fruto de guineo cuadrado, estos últimos presentaron mayor concentración de butirato, lo que se relaciona con pérdidas considerables de nutrimentos en el forraje conservado, además presentaron valores mayores de acetato, lo cual puede repercutir en el consumo voluntario de los animales.

Las mezclas forrajeras disminuyeron la concentración de fibra detergente neutro al pasar de fresco a ensilado, esto se debe a que parte de la hemicelulosa y celulosa del forraje es consumida por las bacterias en el silo, lo que resulta en un aumento en la digestibilidad de los forrajes ensilados y en la capacidad de consumo de los animales. No hubo un cambio significativo en la digestibilidad de la fibra detergente neutro de los forrajes, debido a que este valor proviene de una estimación a partir de la lignina, la cual no varía mucho entre procesos, aunque sí varía entre especies de leguminosas, donde las leguminosas arbustivas fueron las de mayor contenido de fibra detergente neutro indigestible.

El contenido de proteína en las mezclas forrajeras se reduce al pasar de fresco a ensilado, debido a pérdidas durante el ensilaje en forma de nitrógeno amoniacal. Esta degradación de la proteína a nitrógeno amoniacal provoca que los materiales

ensilados posean mayor concentración de fracción A y menor concentración de fracción B1; con respecto a los materiales frescos. La degradación de las proteínas de la fracción B1 a nitrógeno amoniacal, dependen de la calidad del proceso de conservación por lo que controlar la humedad y lograr una adecuada acidificación es fundamental para conservar estos nutrimentos.

Se determinó que la digestibilidad de la fibra detergente neutro tiene un efecto importante sobre la producción de metano, porque la degradación de los polímeros de la fibra es lo que aumenta la producción de metano, de esta manera paredes celulares menos digestibles serán menos emitivas que paredes más disponibles para los microorganismos del rumen. También se encontró que los forrajes Erythrina y Arachis tienen mayor capacidad para reducir la producción de metano, en comparación con los forrajes de Vigna y Cratylia, debido a su concentración de taninos condensados. Además se determinó que la magnitud del efecto es similar entre ambas características.

En cuanto al tipo de carbohidrato, el almidón presente en el maíz fue el que tuvo mayor efecto en reducir la producción de metano, esto se debe a que ocurre un aumento en la producción de propionato y una reducción en la producción de acetato. A pesar de este efecto del almidón de maíz, el almidón del fruto de guineo cuadrado no redujo la producción del gas, sino que las aumentó, lo que sugiere algún patrón de resistencia a la degradación en el ambiente ruminal, por lo tanto las bacterias sólo tienen capacidad para degradar los carbohidratos estructurales del forraje, lo que aumentó la producción de metano en estos tratamientos. Este efecto se confirma en la concentración de los ácidos grasos volátiles del rumen.

El ensilaje tiene la capacidad de reducir la producción de metano, esto es debido a que durante las fases anaeróbicas dentro del silo, se consume una parte de la hemicelulosa y de la celulosa del forraje, al reducir la fibra del forraje se reduce la cantidad de acetato producido en el rumen, lo que a su vez reduce la cantidad de metano producido. No hubo un efecto del proceso del forraje en el contenido de fibra detergente neutro indigestible, debido a que este valor proviene de una estimación a partir de la lignina, la cual no cambió de manera significativa entre tipos de proceso.

## RECOMENDACIONES

Realizar una evaluación de la relación hoja:tallo en los forrajes a analizar debido a su posible efecto sobre la calidad nutricional, sobretodo en el aporte de materia orgánica indigestible a la mezcla ensilada.

Realizar evaluación con otras plantas forrajeras adaptadas a condiciones tropicales, considerando que los hallazgos de esta investigación puedan ser utilizados en otras zonas climáticas del país.

Se debe reducir el contenido de humedad de los materiales forrajeros, además se debe considerar el uso de fuentes altas en carbohidratos solubles ya que los almidones y las pectinas no son tan eficientes para desarrollar un adecuado proceso de ensilaje y no permiten evitar la pérdida de nutrimentos por efluentes y de calidad de los ensilados por degradación de las proteínas de la fracción B1 a nitrógeno amoniacal.

Se debe analizar el perfil de carbohidratos en los frutos de guineo cuadrado, en varios estados de maduración; con la finalidad de conocer el comportamiento que tendrá el fruto; tanto durante el ensilaje como el impacto sobre la producción de metano.

Evaluar el efecto de la digestibilidad de la fibra detergente neutro sobre la producción de metano, en forrajes con bajo contenido de taninos con la finalidad de determinar el verdadero efecto de este parámetro sobre la metanogénesis.

Continuar con las evaluaciones de producción de metano en forrajes y mezclas para ensilajes que puedan servir como herramientas para que los productores puedan aumentar la producción en sus sistemas y realizar una producción más sostenible.

Establecer los análisis de taninos condensados y de taninos hidrolizables en los forrajes que se utilizan en los sistemas de producción del país, para trabajar con valores más confiables y representativos de nuestra realidad productiva.