







Evaluación química y emisión de gas *In-vitro* en ensilados mixtos de King Grass y *Clitoria-ternatea*

Chemical evaluation and *In-vitro* gas emission in mixed King Grass and *Clitoria-ternatea* silages

Serafín Jacobo López-Garrido¹ ,
Diego Arturo Ramos-Ramos² ,
Mónica Marcela Galicia-Jiménez³ ,
Marco Antonio Camacho-Escobar³ ,
Narciso Ysac Ávila-Serrano³ ,
J. Efrén Ramírez-Bribiesca^{4*} 

¹Licenciatura en Zootecnia Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Carretera Vía Sola de Vega Km 1.5. San Pedro Mixtepec, Juquila, CP. 71980, Oaxaca, México.

²Estudiante de Maestría en Producción y Sanidad Animal, Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Carretera Vía Sola de Vega Km 1.5. San Pedro Mixtepec, Juquila, CP. 71980, Oaxaca, México.

³Maestría en Producción y Sanidad Animal, Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Carretera Vía Sola de Vega Km 1.5. San Pedro Mixtepec, Juquila, CP. 71980, Oaxaca, México.

⁴Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo de México. Carretera México-Texcoco, Km 36.5. CP. 56230. Texcoco, Edo. de México. México.

*Autor de correspondencia:
efrenrb@colpos.mx

Artículo científico

Recibido: 06 de marzo 2021

Aceptado: 20 de octubre 2021

Como citar: López-Garrido SJ, Ramos-Ramos DA, Galicia-Jiménez MM, Camacho-Escobar MA, Ávila-Serrano NY, Ramírez-Bribiesca JE (2021) Evaluación química y emisión de gas *In-vitro* en ensilados mixtos de King Grass y *Clitoria-ternatea*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. II: e2973. DOI: 10.19136/era.a8nII.2973

RESUMEN. El estudio evaluó la composición química, degradabilidad de la materia seca, producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) en ensilados mixtos. Se realizaron micro silos de *King grass* CT-115 (*Pennisetum purpureum Schumach*) con la inclusión de 20, 30 y 40% de *Clitoria ternatea* adicionando de 5.0% de melaza y 0.5% de ácido fosfórico. Después de 40 días de fermentación, se determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), pH, nitrógeno amoniacal (NA) y ácidos grasos volátiles (AGV). La fermentación *in vitro* realizada midió la degradabilidad de la materia seca, emisiones de CH₄ y CO₂ a las 24, 48 y 72h. La inclusión de *Clitoria ternatea* en los ensilados aumentó el contenido de MS y PC (P < 0.05) y disminuyeron (P < 0.05) los porcentajes de FDN y FDA. El pH fue menor a 4.5 (P < 0.05) con la adición de ácido fosfórico. Las concentraciones de AGV y de NA indicaron buena calidad de los ensilados. La inclusión de 40% de *Clitoria ternatea* en los ensilados produjo una disminución de 27% de CH₄ (P < 0.05) durante la fermentación *in vitro*. Como conclusión, la inclusión de 40% de *Clitoria ternatea* en ensilados de *King grass* CT-115 mejora la composición química y disminuye las emisiones de CH₄ durante la fermentación ruminal *in vitro*.

Palabras clave: Composición química; fermentación microsilos; forrajes; gases efecto invernadero.

ABSTRACT. The study evaluated the chemical composition, dry matter degradability, methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) production in mixed silage. Micro silos of King grass CT-115 (*Pennisetum purpureum Schumach*) were made with the inclusion of 20, 30 and 40% of *Clitoria ternatea* adding 5.0% molasses and 0.5% phosphoric acid. After 40 days of fermentation, dry matter (DM), crude protein (PC), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), pH, ammonia nitrogen (NA) and volatile fatty acids (VFA) were determined. The *in vitro* fermentation carried out measured dry matter degradability, CH₄ and CO₂ emissions at 24, 48 and 72h. The inclusion of *Clitoria ternatea* in the silages increased the content of DM and PC (P < 0.05) and decreased (P < 0.05) the percentages of NDF and FDA. The pH was less than 4.5 (P < 0.05) with the addition of phosphoric acid. The VFA and NA concentrations indicated good quality of the silage. The inclusion of 40% of *Clitoria ternatea* in the silage produced a decrease of 27% of CH₄ (P < 0.05) during *in vitro* fermentation. In conclusion, the inclusion of 40% of *Clitoria ternatea* in King grass CT-115 silages improves the chemical composition and reduces CH₄ emissions during *in vitro* ruminal fermentation.

Key words: Chemical composition; micro-silos fermentation; forages; greenhouse gases.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes tienen la capacidad de aprovechar los forrajes fibrosos como fuentes de energía a través de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) (Carmona *et al.* 2005). Sin embargo, durante la fermentación ruminal se originan productos finales como el dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄). Estos gases contribuyen al calentamiento global y forman parte de los gases de efecto invernadero (GEI), representando una pérdida de la energía total consumida por parte del rumiante que va de 7 al 15% (Barros *et al.* 2014).

En los últimos años se han implementado estrategias para reducir las emisiones de CH₄ por el potencial negativo de GEI, que es de 21 a 30 veces más que el CO₂ (McCaughy *et al.* 1997). El consumo de los pastos tropicales por los rumiantes, induce a mayores emisiones de CH₄, debido a los bajos contenidos de proteína cruda (PC) y el alto contenido de paredes celulares, disminuyendo la degradabilidad de materia seca (MS) en el rumen (Sánchez 2005, Juárez *et al.* 2009). Los pastos tropicales tienen alta cantidad de celulosa y hemicelulosa, estos polímeros son fermentados por bacterias celulolíticas que transforman la glucosa en acetato y butirato, produciendo en la ruta metabólica iones hidrógeno y CO₂; posteriormente estos sustratos los utilizan las *Archaea* metanogénicas y forman CH₄ (Hill *et al.* 2016). Algunos autores citan que las emisiones de CH₄ disminuyen con la inclusión de especies arbóreas y leguminosas tropicales en la dieta de los rumiantes (Cárdenas *et al.* 2003). Entre las leguminosas destaca la *Clitoria ternatea*, con 16 a 21% de PC (Bustamante 2004) y un contenido menor a 40% en paredes celulares (Bugarín *et al.* 2009). Una de las estrategias que permiten la adecuada conservación y la calidad de los nutrientes de las leguminosas es mediante el ensilaje. En las condiciones del trópico, la elaboración de ensilados es una alternativa que puede conservar el forraje excedente producido en la época de lluvia y utilizado en la temporada de sequía (Cárdenas *et al.* 2003). Generalmente los ensilados se elaboran con gramíneas que tienen baja cantidad de proteína, alto valor de fibra

y baja cantidad de carbohidratos solubles (McDonald *et al.* 2011). El contenido de azúcares en los ensilados es necesario para tener una adecuada fermentación láctica, sin embargo, el bajo contenido de PC limita el valor nutritivo del ensilado (Cárdenas *et al.* 2003). Adicionalmente, la *Clitoria ternatea* ha sido incorporada a los silos de gramíneas entre 20 y 50% con el propósito de aumentar los contenidos de PC y minerales (Villanueva *et al.* 2004), pero este forraje tiene bajo contenido de azúcares solubles, las consecuencias durante el proceso del ensilaje es la baja fermentación y el aumento de amoníaco; antagonizando la disminución del pH hasta 4.0 (Cárdenas *et al.* 2003). Por lo tanto, es necesario adicionar a los ensilados mixtos de gramíneas y leguminosas una fuente de carbohidratos solubles, como la melaza, para realizar una fermentación láctica (Heinritz *et al.* 2012). Durante la fermentación del ensilaje proliferan bacterias ácido lácticas formadoras de ácidos orgánicos como láctico, acético, propiónico y a menor concentración el butírico; todos estos acidifican el ensilado causando un descenso del pH hasta 4.0 (Hafner *et al.* 2013), sin alterarse la composición química del ensilado hasta su apertura (Santos da Silva *et al.* 2014).

La fermentación acético-propiónico en los ensilados se ha obtenido con el uso de aditivos como el ácido fosfórico (disminuye el pH a 5.0), induciendo la fermentación anaerobia para la producción de ácidos orgánicos (Dunière *et al.* 2013). La inclusión de leguminosas tropicales en los ensilados tiene el propósito de corregir las deficiencias de proteínas que presentan las gramíneas. Sin embargo, algunas investigaciones han reportado que suplementos con alfalfa y trébol en las dietas para el ganado aumentaron las emisiones de CH₄ ruminal (Carulla *et al.* 2005). Por su parte, Vargas *et al.* (2012) después de realizar una amplia revisión sobre la emisión de CH₄ en dietas mixtas de gramíneas y leguminosas, concluyeron diferentes respuestas y resultados contradictorios. En las investigaciones sobre emisiones de GEI en silos mixtos de gramíneas y leguminosas tropicales aún existe poca información. El objetivo de este estudio fue determinar la composición química, medir la degradabilidad de la MS y cuantificar las emi-

siones de CH₄ y CO₂ *in vitro* con ensilados de King grass CT-115 (*Pennisetum purpureum* Schumach) e incorporando los contenidos de 20, 30 y 40% de *Clitoria ternatea* con la adición de 5.0% de melaza y 0.5% de ácido fosfórico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El cultivo se realizó durante la época de lluvia en el Campo Experimental de la Universidad del Mar, ubicada en Puerto Escondido, San Pedro Mixtepec Juquila, Oaxaca, México. Se sembraron superficies de pasto *King grass* (CT-115) en el área de una hectárea con uso del suelo al mínimo laboreo a 0.90 m entre cada surco de sembrado. En el caso de la *Clitoria ternatea*, la siembra se realizó manualmente a 80 cm de distancia del surco, introduciendo la semilla a una profundidad de 2 cm considerando una densidad de 38 semillas por cada m². Posteriormente las muestras de forrajes se cosecharon al inicio de la floración, realizando cortes aleatorios a los 45 y 60 días después de la siembra, respectivamente. Estas fueron representativas de cada superficie y no estuvieron contaminadas de materia vegetativo muerto u otras variedades de plantas y contaminantes de suelo. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Licenciatura en Zootecnia, Universidad del Mar, y en el Laboratorio de Nutrición Animal del programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México.

Asignación de los tratamientos

Las muestras de los forrajes se picaron a un tamaño de partícula de menos de un centímetro. Posteriormente los tratamientos se distribuyeron con las siguientes mezclas: C20f = 75% de pasto King grass + 20% de *C. ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5% de ácido fosfórico; C20 = 75% de pasto King grass + 20% de *C. ternatea* + 5.0% de melaza; C30f = 65% de pasto King grass + 30% de *C. ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5% de ácido fosfórico; C30 = 65% de pasto King grass + 30% de *C. ternatea* + 5.0% de melaza; C40f = 55% de pasto King grass + 40% de

C. ternatea + 4.5% de melaza + 0.5 de ácido fosfórico; C40 = 55% de pasto King grass + 40% de *C. ternatea* + 5.0% de melaza. Se elaboraron microsilos fabricados con policloruro de vinilo (PVC) de cuatro pulgadas de diámetro, se llenaron por quintuplicado con 1.4 kg de cada tratamiento; cantidad necesaria para facilitar la compactación, el sellado y almacenamiento a temperatura ambiente en condiciones de laboratorio (21 °C) por 40 días para darse el proceso de fermentación del ensilaje.

Análisis químico de los ensilados

Después de la fermentación, los microsilos se destaparon y se tomaron 300 g muestras de cada unidad experimental, secándose a 45°C por 48h en una estufa de aire forzado. Las muestras se le determinó las cantidades de MS, PC (AOAC 1995) fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Georing y Van Soest 1970). pH: Se pesaron 50 g de cada tratamiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL, aforándose con 100 mL de agua destilada; posteriormente las mezclas se molieron en una licuadora, se reposaron por 20 minutos y se cuantificó el pH con un potenciómetro portátil Orion 290. Ácidos grasos volátiles: Las muestras se analizaron con un equipo de cromatografía de Gases Perkin Elmer® Clarus 500, U.S.A. con un detector de ionización con flama, automuestreador y una columna capilar Elite FFAP. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de horno 130°C, y del inyector y la columna capilar (15X0.32 m) 250°C. Los tiempos de retención fueron 1.26 min para acetato, 1.6 min propionato y 2.09 min butirato. Nitrógeno amoniacal: Se determinó con la técnica descrita por McCullough (1967). Se usaron las mismas muestras preparadas para medir los AGV. Se tomaron 2 mL de la solución y se centrifugaron a 3 500 rpm por 25 minutos. El sobrenadante de la muestra se tomó y vertió en viales de 2.5 mL, almacenándose en refrigeración a 4°C hasta su análisis. La absorbancia se registró en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible Varian CARY 1-E a 630 nm.

Fermentación *in vitro* de los ensilados con líquido de rumen

Obtención del líquido de rumen: Se uti-

lizaron 3 ovinos machos de 1 año de edad canulados en rumen. Los animales estuvieron alimentados con una dieta de forraje y concentrado a 70 (King grass y *Clitoria ternatea*): 30% (ensilado). Los animales se mantuvieron bajo el cuidado de la norma sobre el *Uso de los Animales para Experimentación* que está vigente en el Colegio de Postgraduados. La muestra de líquido de rumen se colectó de todos los animales, filtrándose en 3 capas de manta de cielo y mezclándose en un termo a temperatura interna de 39°C, durante la mañana. El líquido de rumen conservado se transportó al laboratorio en un tiempo máximo de 5 minutos para utilizarse en la preparación del cultivo *in vitro* de las muestras experimentales.

Fermentación de gas *In vitro*: Las dietas experimentales se molieron en un molino (Wiley® malla de 2 mm) y se pesaron 0.5 g de MS de muestra con 6 repeticiones por tratamiento en viales de 120 mL. Posteriormente se les agregó 45 mL de medio de cultivo con el líquido de rumen a cada vial, bajo condiciones anaeróbicas con el flujo de CO₂. La producción de gas (CH₄ y CO₂) se cuantificó mediante la técnica descrita por Krabill *et al.* (1969) y modificada por Cobos *et al.* (2018). Los viales se incubaron en un baño María a 39°C, colocándose trampas de captura del gas a través de una manguera Tygon® con un diámetro interior de 3/32" y agujas marca Terumo® de calibre 20 GX1" en cada extremo. La aguja del primer extremo de la manguera se colocó al vial y la otra a la trampa de captura del gas que contenía solución salina saturada. La producción del gas total se cuantificó midiendo el desplazamiento del líquido de las trampas en la probeta a las 24, 48 y 72 h de fermentación. Posteriormente se tomó una muestra de 500 µL del gas atrapado para medir las proporciones de CH₄ y CO₂ por cromatografía de gases (mismo equipo descrito anteriormente). Las condiciones de detección fueron las siguientes: temperaturas de horno 80°C, columna empacada 170°C y detector de conductividad térmica 130°C; los tiempos de retención fueron 0.71 y 1.005 min para CH₄ y CO₂, respectivamente. El gas acarreador fue helio con un flujo de 23 mL m⁻¹. La concentración molar de CH₄ y CO₂ se calcularon según la ecuación de los gases ideales (Posada y

Noguera 2005).

La cuantificación de la degradabilidad *In vitro* de la materia seca (DIVMS) se obtuvo a las 72 h filtrando las muestras con papel Whatman hasta las 72h de incubación. Se incluyeron las muestras testigo (solo líquido de rumen sin muestra) y los tratamientos, aplicando la fórmula siguiente: $DIVMS = 1 - R - BS$, donde R (g) es el peso del residuo del sustrato, B (g) es el peso del residuo del blanco y S es la MS peso del sustrato inicial.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se condujo mediante un diseño experimental completamente aleatorio con seis tratamientos y cinco repeticiones. La información se analizó con el programa estadístico SAS (2010) a través de PROC GLM, considerando el efecto de los tratamientos para las variables fisicoquímicas de los ensilados y los efectos de tratamientos y tiempos (analizado solo en los tratamientos) para las variables de fermentación *In vitro*. La comparación de medias se realizó con el estadístico de prueba Tukey (Steel y Torrie 1988) a una significancia menor de 0.5.

RESULTADOS

Análisis químico de los ensilados

La Tabla 1 muestra los resultados de la composición química de los ensilados a los 40 d de fermentación. El porcentaje de MS fue mayor ($P < 0.05$) en los ensilados que contenían 30 y 40% de *Clitoria ternatea*, los resultados indican que a medida que aumenta la inclusión de la leguminosa, se incrementa el contenido de MS; la adición de ácido fosfórico no tuvo efecto sobre el contenido de MS en los ensilados.

El contenido de PC fue mayor ($P < 0.05$) en los ensilados con 40% de *Clitoria ternatea*, (10.21 vs. 8.6%), comparada con los demás tratamientos. En el caso del ensilado con 20% de *Clitoria ternatea*, el grupo con ácido fosfórico (C20f) aumentó un 13% la proteína. Adicionalmente, los ensilados con 40% de *Clitoria ternatea* tuvieron menores ($P < 0.05$) cantidades de FDN y FDA.

Por otro lado, se obtuvo un pH menor ($P < 0.05$) en el ensilado C20f que contenía 20% de *Clito-*

Tabla 1. Composición química de ensilados mixtos de King grass CT-115 con *Clitoria ternatea*.

Componentes, %	C20f	C20	C30f	C30	C40f	C40	EEM ¹
Materia seca	28.52 ^c	28.90 ^c	31.15 ^b	31.59 ^b	32.73 ^{ab}	33.34 ^a	0.33
Proteína cruda	9.23 ^b	8.19 ^c	8.50 ^{bc}	8.51 ^{bc}	10.31 ^a	10.12 ^a	0.21
Fibra detergente neutro	66.15 ^a	65.80 ^a	65.48 ^a	64.38 ^a	59.56 ^b	59.26 ^b	0.89
Fibra detergente ácido	49.16 ^a	48.35 ^a	47.04 ^a	48.39 ^a	45.61 ^{ab}	42.18 ^b	0.73

^{abc} Medias con literales diferentes en la misma hilera indican diferencia ($P < 0.05$). ¹ EEM: Error estándar de la media. C20f: 75% de King Grass + 20% de *Clitoria ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5% de ácido fosfórico. C20: 75% de King Grass + 20% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza. C30f: 65% de King Grass + 30% de *Clitoria ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5% de ácido fosfórico. C30: 65% de King Grass + 30% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza. C40f: 55% de King Grass + 40% de *Clitoria ternatea* + 4.95% de melaza + 0.05% de ácido fosfórico. C40: 55% de King Grass + 40% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza.

ria ternatea y ácido fosfórico (Tabla 2). Por otro lado, se obtuvo un pH menor ($P < 0.05$) en el ensilado C20f que contenía 20% de *Clitoria ternatea* y ácido fosfórico (Tabla 2). El ensilado con 30% de *Clitoria ternatea* (C30f) registró la mayor producción de AGV ($P < 0.05$). El ácido propiónico fue el de mayor proporción ($P < 0.05$) a diferencia de todos los demás tratamientos; en el caso de C40 o C40f no tendió a mejorar la proporción de los AGV, pero fue mayor ($P < 0.05$) el contenido de N-Total vs. C20f y C20.

Fermentación *in vitro* de los ensilados

La DIVMS de los ensilados no presentó cambios ($P > 0.05$) con la inclusión de la leguminosa. Solamente el ensilado C30f con 30% de *Clitoria ternatea* y ácido fosfórico incrementó el porcentaje ($P < 0.05$) de DIVMS (Tabla 3). Todos los ensilados tuvieron una DIVMS entre 51.13 a 54.79%.

La Tabla 3 muestra las emisiones de CH₄ y CO₂ de los tratamientos. Los ensilados con 20 y 30% de *Clitoria ternatea* presentaron mayores ($P < 0.05$) emisiones de CH₄ a las 24h. En los ensilados con 40% de *Clitoria ternatea* la emisión de CH₄ disminuyó 27.6% ($P < 0.05$) a las 72h. En general, se presentó disminución progresiva de las emisiones de CH₄ a medida que aumentó la inclusión de *Clitoria ternatea* en los ensilados.

DISCUSIÓN

Análisis químico de los ensilados

Los valores de MS en los ensilados fueron de

28 hasta 33%, consideradas como cantidades adecuadas (Reyes *et al.* 2018). Estudios realizados por otros autores reportan aumento en el contenido de MS en ensilajes de pastos cuando se agrega melaza como aditivo (Rusdy 2015) o cuando se incluyen leguminosas en ensilajes de pastos tropicales (Ojeda y Díaz 1991). En este estudio, la asociación entre la melaza y el contenido de nitrógeno con 30 y 40% de *Clitoria ternatea*, fueron suficientes para que las bacterias lácticas mantuvieran su tasa de proliferación. El contenido de proteína cruda de los ensilados coincidió con un estudio donde se evaluó la inclusión de 30 y 45% de leguminosas en ensilados de pastos tropicales (Cárdenas *et al.* 2003); aunque también se reporta porcentajes de proteína cruda mayores a 12% en ensilados mixtos de pastos con 30% de leguminosas (Blanco *et al.* 2005). Como se mencionó, el ensilado con 20% de *Clitoria ternatea* y ácido fosfórico (C20f) mejoró el contenido de proteína, aunque este mismo efecto no sucedió en los ensilados con 40% de *Clitoria ternatea* (40 y C40f) posiblemente hay una tasa máxima de degradación donde el fósforo activa las bacterias ácido lácticas y mejoran la disponibilidad del nitrógeno (Metzler-Zebeli *et al.* 2018).

La inclusión de 40% de *Clitoria ternatea* en los ensilados disminuyeron los porcentajes de FDN y FDA, investigaciones similares también reportan porcentajes menores de FDN y FDA (Blanco *et al.* 2005, Nunes *et al.* 2007). Así, se deduce que la disminución de las proporciones de FDN y FDA en los ensilados con 40% de *Clitoria ternatea*, es por las menores cantidades de celulosa y hemicelulosa que contienen

Tabla 2. Características de la fermentación de los ensilados mixtos de *King grass* CT-115 con *Clitoria ternatea*.

Componentes	C20f	C20	C30f	C30	C40f	C40	EEM ¹
pH	3.80 ^a	4.16 ^b	4.17 ^b	4.39 ^b	4.10 ^{ab}	4.40 ^b	0.06
AGV ²							
Acético	0.92 ^b	1.16 ^{ab}	1.38 ^a	1.22 ^{ab}	1.19 ^{ab}	1.04 ^b	0.03
Propiónico	0.51 ^c	0.73 ^{bc}	1.06 ^a	0.97 ^{ab}	0.78 ^{abc}	0.60 ^c	0.05
Butírico	0.23 ^b	0.36 ^{ab}	0.57 ^a	0.46 ^{ab}	0.38 ^{ab}	0.22 ^b	0.02
NA ³ , % N-Total	1.61 ^e	2.00 ^d	2.46 ^c	3.16 ^b	2.71 ^c	3.91 ^a	0.18

^{abcde} Medias con literales diferentes en la misma hilera indican diferencia (P < 0.05). ¹ Error estándar de la media. ² Ácidos grasos volátiles en porcentaje de materia seca. ³ Nitrogeno Amoniacal. C20f: 75% de King Grass + 20% de *Clitoria ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5 % de ácido fosfórico. C20: 75% de King Grass + 20% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza. C30f: 65% de King Grass + 30% de *Clitoria ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5 % de ácido fosfórico. C30: 65% de King Grass + 30% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza. C40f: 55% de King Grass + 40% de *Clitoria ternatea* + 4.95% de melaza + 0.05% de ácido fosfórico. C40: 55% de King Grass + 40% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza.

Tabla 3. Degradabilidad de la materia seca, producción de metano y dióxido de carbono durante la fermentación ruminal *in vitro* de ensilados mixtos de King grass CT-115 y *Clitoria ternatea* durante diferentes horas de incubación.

Componentes	C20f	C20	C30f	C30	C40f	C40	EEM ¹
DIVMS [†] , %	51.28 ^a	53.13 ^{ab}	54.79 ^b	51.93 ^{ab}	53.23 ^{ab}	53.60 ^{ab}	0.36
CH ₄ , mL g MS ⁻¹							
24 h	45.19 ^a	44.49 ^a	43.29 ^a	38.59 ^b	36.99 ^b	31.66 ^c	0.41
48 h	53.46 ^a	49.05 ^b	48.59 ^b	43.89 ^c	41.35 ^d	35.89 ^e	0.43
72 h	58.60 ^a	50.93 ^b	50.03 ^b	45.20 ^c	45.42 ^c	37.36 ^d	0.64
CO ₂ , mL g MS ⁻¹							
24 h	206.10 ^a	202.87 ^a	197.40 ^a	173.97 ^b	168.67 ^b	144.23 ^c	2.00
48 h	243.77 ^a	223.67 ^b	221.57 ^b	200.14 ^c	188.55 ^d	163.66 ^e	1.96
72 h	267.22 ^a	232.24 ^b	228.14 ^b	206.11 ^c	191.80 ^d	170.36 ^e	2.95

^{abcde} Medias con literales diferentes en la misma hilera indican diferencia (P < 0.05). ¹EEM: Error estándar de la media. [†] DIVMS: Degradabilidad *in vitro* de la materia seca. C20f: 75% de King Grass + 20% de *Clitoria ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5 % de ácido fosfórico. C20: 75% de King Grass + 20% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza. C30f: 65% de King Grass + 30% de *Clitoria ternatea* + 4.5% de melaza + 0.5 % de ácido fosfórico. C30: 65% de King Grass + 30% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza. C40f: 55% de King Grass + 40% de *Clitoria ternatea* + 4.95% de melaza + 0.05 % de ácido fosfórico. C40: 55% de King Grass + 40% de *Clitoria ternatea* + 5.0% de melaza.

las leguminosas a diferencia de las gramíneas (Cal-samiglia 1997, López *et al.* 2001). La adición de melaza a los ensilados mixtos con leguminosas es una fuente importante de energía y actúa como estimulante de la fermentación. En este estudio se deduce que la melaza activó la proliferación de las bacterias acidolácticas, incrementándose la concentración de ácidos orgánicos y bajando el pH del ensilado a menos de 4.5 (Heinritz *et al.* 2012, Hafner *et al.* 2013). En general, el contenido de ácido acético de este estudio fue inferior a 1.5% de MS, característica deseable en un ensilaje de buena calidad (McDonald *et al.* 2011). Resultados similares se reportaron en ensilados mixtos de Ryegrass y trébol (De-

whurst *et al.* 2003). En contraste, también hay un estudio indicando el nivel máximo de 2.9% de ácido acético en ensilajes mixtos de gramíneas y leguminosas (Cárdenas *et al.* 2003). La cantidad de ácido acético en los ensilados de este estudio indican la actividad de una fermentación láctica, debido a que los contenidos de ácido acético fue menor a 2.0% (McDonald *et al.* 2011), ácido propiónico inferior a 1.0% (Cárdenas *et al.* 2003) y ácido butírico menor al 0.6% de la MS. Heinritz *et al.* (2012) reportaron cantidades menores a 4.0% de AGV y nivel máximo de 0.6% en ácido butírico, cuando se adicionó 5.0% de melaza a ensilados de leguminosas; datos coincidentes con el presente estudio realizado.

La concentración de NA como porcentaje de nitrógeno total, fue menor a 4.0% en todos los ensilados. A medida que aumentó la inclusión de *Clitoria ternatea* se incrementó la concentración de NA. En contraste, otros estudios reportan variaciones en el NA, por ejemplo, Suárez et al. (2011) hallaron un contenido de NA mayor a 18% en ensilados mixtos de gramíneas y leguminosas. Clavero y Razz (2011) reportaron la cantidad de NA menor a 1.0% en ensilados mixtos de King grass y *Leucaena leucocephala*. Comúnmente, los ensilados con fermentación láctica tienen un contenido de NA inferior a 8% (Cárdenas et al. 2003, Blanco et al. 2005). En el estudio realizado, la menor producción de NA en C20f, C20 y C30f posiblemente fue debido a la actividad del ácido fosfórico, ocasionando proteólisis y la rápida disminución del pH en los ensilados (Chaverra y Bernal 2001, Ellis et al. 2016).

En el caso de la DIVMS, los tratamientos no sobrepasaron el valor de 55%. Otros estudios reportan datos similares (Cárdenas et al. 2003) en ensilados mixtos de gramíneas y leguminosas, cuando se comparan con ensilados de forrajes únicos (Cárdenas et al. 2003). La DIVMS en ensilados de leguminosas o gramíneas depende de las especies y proporciones usadas (Yahaya et al. 2002).

Fermentación *in vitro* de los ensilados

En este estudio la DIVMS de los ensilados no presentó cambios a medida que aumentó la inclusión de *Clitoria ternatea*, esta respuesta posiblemente se debió a que cantidades de FDA y FDN no fueron suficientes para modificar las poblaciones microbianas en el rumen (Betancourt et al. 2002). Sin embargo, la inclusión de *Clitoria ternatea* hasta 40% en los ensilados, tuvo efecto para reducir las emisiones de CH₄ y CO₂ en 27%; resultados similares se han observado con fermentaciones *in vitro* a 72 h en ensilados mixtos de Ray grass y trébol (Blanco et al. 2005), lo cual indica que las leguminosas como la *Clitoria ter-*

natea, alfalfa y el trébol durante las primeras 24h de fermentación ruminal, producen mayor volumen de CH₄ (Muck et al. 2007). Los ensilados de gramíneas tropicales tienen mayor contenido de paredes celulares y al fermentarse contribuyen al aumento de las emisiones de CH₄ (Ley et al. 2018). Los resultados del estudio indican que la producción de gas (CH₄ y CO₂) aumentó con el tiempo de fermentación *in vitro* de los ensilados, pero disminuyó cuando se incrementó el nivel de *Clitoria ternatea*. Archiméde et al. (2011) señalan que el uso de leguminosas tropicales en la dieta de los rumiantes reduce las emisiones de CH₄ debido a que poseen mayor contenido de nitrógeno. Por su parte, Shibata y Terada (2010), indican que es posible reducir la producción de CH₄ cuando se aumenta el nivel de proteína en la dieta de los rumiantes. Aunque la producción de CH₄ está estrechamente relacionada con la composición química de la dieta y la interacción entre los ingredientes durante la fermentación ruminal (Cobos et al. 2018).

CONCLUSIONES

La inclusión de 30 y 40% de *Clitoria ternatae* en ensilados mixtos de King grass-CT-115 incrementaron la cantidad de materia seca y proteína cruda, disminuyendo el contenido de FDN y FDA. La fermentación del ensilaje, no afectó la producción de NA (menor a 4.0%). La cantidad de 40% de *Clitoria ternatea* en el ensilado disminuyó en 27% las emisiones de CH₄ y CO₂ durante la fermentación ruminal *in vitro*. La adición de ácido fosfórico a los ensilados produjo disminución de la degradación de proteína y del NA. En esta investigación se comprobó que la *Clitoria ternatae* es una opción para mejorar la calidad nutricional del ensilaje de King grass y reducir las emisiones de CH₄ y CO₂ durante la fermentación ruminal *in vitro*.

LITERATURA CITADA

AOAC (1995) Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA. 1298p.

- Archimède H, Eugène M, Marie Magdeleine C, Boval M, Martin C, Morgavi DP, Lecomte P, Doreau M (2011) Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology* 167: 59- 64.
- Barros RMA, Solorio SFJ, Sandoval CCA, Ahmed AMM, Rojas HR, Briceño PEG, Ku VJC (2014) Effect of intake of diets containing tannins and saponins on *in vitro* gas production and sheep performance. *Animal Production Science* 54: 1486-1489.
- Betancourt de FM, Clavero T, Razz R (2002) Características nutritivas del ensilaje de *Leucaena leucocephala* con diferentes aditivos. *Revista Científica* 12: 502-504.
- Blanco GM, Chamorro DR, Arreaza L (2005) Evaluación nutricional del ensilaje de *Sambucusperuviana*, *Acacia decurrens* y *Avena sativa*. *Revista Corpoica* 6: 82-85.
- Bugarín J, Lemus C, Sangines L, Aguirre J, Ramos A, Soca M, Arece J (2009) Evaluación de dos especies de *Leucaena*, asociadas a *Brachiaria brizantha* y *Clitoria ternatea* en un sistema silvopastoril de Nayarit, México. II Producción y composición. *Pastos y Forrajes* 32: 1-7.
- Bustamante GJ (2004) Utilización de heno de *Clitoria* en la alimentación de becerras lactantes de propósito lechero. INIFAP. México. 30p.
- Calsamiglia S (1997) Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas para rumiantes. XV curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 1ª Edición. 16p.
- Cárdenas MJV, Castro CAS, Sandoval CCA, Solorio SFJ (2003) Composición química de ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas de Yucatán, México. *Técnica Pecuaria México* 41: 283-294.
- Carmona JC, Bolivar DM, Giraldo LA (2005) El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18: 49-63.
- Carulla JE, Kreuzer M, Machmüller A, Hess HD (2005) Supplementation of *Acacia mearnsii* tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal Agriculture Research* 56: 961-970.
- Chaverra G, Bernal JE (2001) Ensilaje en la alimentación de ganado vacuno. IICA. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia 123p.
- Clavero T, Razz R (2011) Compuestos nitrogenados y características fermentativas de ensilajes de mezclas de King Grass-*Leucaena leucocephala*. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ* 28: 83-88.
- Cobos MA, Curzayns KR, Rivas MI, Santillan EA, Barcena JR (2018) Efecto *in vitro* de dietas para corderos más un suplemento de granos secos de destilería en la fermentación ruminal y emisión de gases. *Agrociencia* 52: 203-215.
- Dewhurst RJ, Fisher WJ, Tweed JKS, Wilkins RJ (2003) Comparison of grass and legume silages for milk production. 1 Production responses with different levels of concentrates. *Journal Dairy Science* 86: 2612-2621.
- Dunière L, Sindou J, Chaucheyras DF, Chevallier I, Thévenot SD (2013) Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* 182: 1-15.
- Ellis JL, Bannink A, Hindrichsen IK, Kinley RD, Pellikaan WF, Milora N, Dijkstra J (2016) The effect of acid bacteria included as a probiotic or silage inoculants on *in vitro* rumen digestibility, total gas and methane production. *Animal Feed Science and Technology* 211: 61-74.

- Goering HK, Van-Soest FJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA. Agricultural Handbook Vol. 379, Whashington D.C. USA. 20p.
- Hafner SD, Howard C, Muck RE, Franco RB, Montes F, Green PG, Mitloehner F, Trabuef SL, Rotza CA (2013) Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications. *Atmospheric Environment* 77: 827-839.
- Heinritz SN, Martens SD, 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: 201-210.
- Hill J, McSweeney C, Wright ADG, Bishop HG, Kalantar ZK (2016) Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnology* 34: 26-35.
- Juárez RA, Cerrillo SM, Gutiérrez OE, Romero TE, Negrete CJ, Bernal BH (2009) Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Técnica Pecuaria México* 47: 55 - 67.
- Krabill LF, Alhassan WS, Satter LD (1969) Manipulation of the ruminal fermentation. 2. Effect of sodium sulfite on bovine digestion and ruminal fermentation. *Journal of Dairy Science* 52: 1812-1816.
- Ley de Coss A, Guerra MC, Montañez VO, Guevara HF, Pinto RR, Reyes GJ (2018) Producción *in vitro* de gas metano por gramíneas forrajeras tropicales. *Revista MVZ Córdoba* 23: 6788-6798.
- López JL, Mederos CM, Pérez CR (2001) Nota sobre la composición química del follaje de dos variedades de conchita azul (*Clitoria ternatea* L.) *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 8: 28-35.
- McCaughy WP, Wittenberg M, Corrigan D (1997) Methane production by steers on pasture. *Canadian Journal of Animal Science* 77: 519-524.
- McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by direct calorimetric method. *Clinical Chemical Acta* 17: 297-304.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2011) Ensilado. En: McDonald P (ed.) *Nutrición animal*. 7a edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp: 473-494.
- Metzler-Zebeli BU, Haselmann A, Klevenhusen F, Knaus W, Zebeli Q (2018) Lactic acid treatment of by-products and phosphorus level in the diet modulate bacterial microbiome and the predicted metagenome functions using the rumen simulation technique. *Journal of Dairy Science* 101: 9800-9814.
- Muck RE, Folia I, Contreras GFE (2007) Inoculants effects on alfalfa silage: *In vitro* gas and volatile fatty acid production. *Journal of Dairy Science* 90: 5115-5125.
- Nunes H, Zanine A de M, Machado TMM, de Carvalho FC (2007) Alimentos alternativos na dieta dos ovinos: Uma revisao. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 4: 147-158.
- Ojeda GF, Díaz D (1991) Ensilajes de gramíneas y leguminosas para la producción de leche. I. *Panicum máximum* cv, *Likoni* y *Lablab purpureus* cv. *Rongai. Pastos y Forrajes* 14: 175-184.
- Posada SL, Noguera RR (2018) Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 17:1-18.
- Reyes GJ, Montañez VO, Guerra MC, Ley-De-Coss A (2018) Efecto de la inclusión de aditivos sobre la calidad del ensilado de caña de azúcar. *Revista MVZ Córdoba* 23: 6710-6717.

- Rusdy M (2015) Effects of additives on fermentation characteristics and chemical composition of ensiled *Chromolaena odorata* leaves. *Livestock Research of Rural Development*. 27: 60. <http://www.lrrd.org/lrrd27/4/rusd27060.html>. Fecha de consulta: 23 de agosto de 2020.
- Sánchez ML (2005) Estrategias modernas para la conservación de forrajes en sistemas de producción bovina tropical. *Revista Corpoica* 6: 69-81.
- Santos da Siva W, Carvalho dos Santos TM, Cavalcanti NCC, Espíndola FAM, Mesquita da Silva SG, Figueiredo AN, Araujo de Melo B (2014) Características y estabilidad aeróbica de ensilajes de caña de azúcar, tratada con urea, NaOH y maíz. *Pastos y Forrajes* 37: 182-190.
- Shibata M, Terada F (2010) Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Animal Science Journal* 81: 2-10.
- SAS (2010) Statistical Analysis System, User's guide. Version 9.2: SAS Institute. User's Guide: Statistics, Cary, NC, USA Inst. Inc. 60p.
- Steel RGD, Torrie JH (1988) *Bioestadística: Principios*. McGraw Hill, México. 622p.
- Suárez R, Mejía J, González M, García DE, Perdomo DE (2011) Evaluación de ensilajes mixtos de *Saccharum officinarum* y *Gliricidia sepium* con la utilización de aditivos. *Pastos y Forrajes* 34: 69-86.
- Vargas J, Cárdenas E, Pabón M, Carulla J (2012) Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Archivos de Zootecnia* 61: 51-66.
- Villanueva AJF, Bonilla CJA, Rubio CJV, Bustamante GJ (2004) Agrotecnia y utilización de la *Clitoria ternatea* en sistemas de producción de carne y leche. *Técnica Pecuaria México* 42: 79-96.
- Yahaya MS, Kawai M, Takahashi J, Matsuoka S (2002) The effects of different moisture content and ensiling time on silo degradation of structural carbohydrate of *Orchardgrass*. *Journal of Animal Science* 15: 213-217.