

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE ZOOTECNIA

Emisiones in vitro de metano y parámetros ruminales a partir de mezclas ensiladas de Cratylia (*Cratylia argentea*), Poró (*Erythrina poeppigiana*) y Guineo cuadrado (*Musa acuminata* x *balbiana*, Grupo ABB)

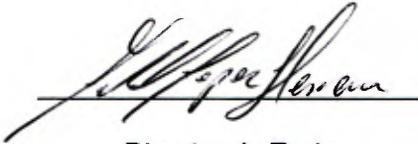
Ricardo Xavier Alvarez Brito

Tesis presentada para optar por el título de Licenciado en Ingeniería Agronómica con
énfasis en Zootecnia

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2017

Esta tesis fue aceptada por la Comisión Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciado.



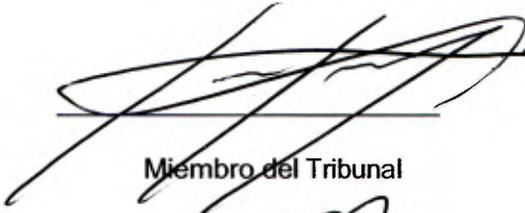
Director de Tesis

M.Sc. Michael López Herrera



Miembro del Tribunal

M.Sc. Augusto Rojas Bourrillon



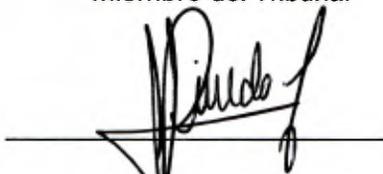
Miembro del Tribunal

Lic. Carlos Campos Granados



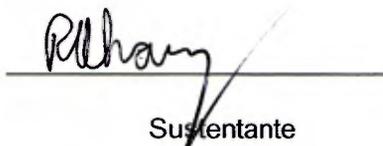
Miembro del Tribunal

Ph. D. Luis Villalobos Villalobos



Miembro del Tribunal

M.Sc. Luis Pineda Cordero



Sustentante

Bach. Ricardo Xavier Alvarez Brito

DEDICATORIA

A mi abuela que me hizo darle mi palabra de que terminaría, a mis padres que siempre han estado ahí para mí, mis hermanos que han caminado a mi lado toda mi vida, mis tíos y tías por ser otros padres y madres para mí, a mi esposa por llegar en el momento correcto para darme el impulso que necesitaba y apoyarme durante el final del camino para poder lograrlo y por supuesto a mi hija que se convirtió en mi mayor inspiración y motivación para saber que nunca es muy tarde para lograrlo y cumplir los sueños.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo debo agradecer al profesor Michael López por ser más que un tutor, sino un guía en este duro camino y estar siempre atento y motivándome a que culminara. Al personal del Centro de Investigación en Nutrición Animal y a Marcela, Karen y José Ángel por toda la ayuda brindada en la parte experimental.

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EVALUADOR	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCION.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Procesos de remoción de H⁺	3
Proceso de ensilaje	8
Uso de Musáceas	12
Técnicas de medición de CH₄	12
Objetivos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Determinación de la fibra detergente neutro digestible e indigestible	16
Determinación de Almidón	17
Determinación de CH₄	17
Determinación de AGV	18
Determinación de N amoniacal	18
Simulación de la emisión entérica	18
Análisis de la información	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Calidad nutricional de las mezclas ensiladas y calidad de la fibra	20
Almidón	20

Pectinas	22
Fibra Detergente Neutro Digestible (dFDN) e Indigestible (iFDN)	23
Parámetros de fermentación ruminal de las mezclas ensiladas	25
Nitrógeno Amoniacal	25
Ácidos Grasos Volátiles	28
Metano	30
Simulación de la emisión de metano entérico	33
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	38
LITERATURA CONSULTADA	39
ANEXO	49

INDICE DE CUADROS

CUADRO	TITULO	Página
1	Análisis nutricional de las diferentes materias primas utilizadas en la elaboración de los silos en el presente ensayo.	11
2	Composición nutricional del ensilaje de Cratylia y Poró con 4 niveles de inclusión de guineo cuadrado (0,15, 30, 45%).	16
3	Contenido de almidón, pectinas y digestibilidad de la fibra de los tratamientos a 50 días de ensilaje.	20
4	Contenido <i>in vitro</i> de las variables de la fermentación ruminal de los tratamientos a 50 días de ensilaje. San José, Costa Rica 2016.	26
5	Producción de CH ₄ (L CH ₄ /animal/día) según las diferentes relaciones pasto: ensilado (% MS).	34
6	Potencial de producción de leche (kg) según los kg de ensilaje consumido	34

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	Página
1	Promedios de concentración de almidón (%MS) en los tratamientos ensilados de acuerdo al nivel de inclusión de guineo cuadrado.	21
2	Promedios de concentración de pectinas (g/ 100g) en los tratamientos ensilados de acuerdo al nivel de inclusión de guineo cuadrado.	23
3	Contenido de Fibra Detergente Neutro Digestible (% FDN) presente en los diferentes silos según el nivel de inclusión de guineo cuadrado.	25
4	Concentración de nitrógeno amoniacal (mg/100 ml) presente en los diferentes silos según el nivel de inclusión de guineo cuadrado.	26
5	Concentración de los diferentes AGV determinados en el estudio.	28
6	Producción <i>in vitro</i> de CH ₄ (l/kg) tanto de MS como de MSD de los diferentes silos según el porcentaje de inclusión de guineo cuadrado.	32

INDICE DE ANEXOS

FIGURA	TITULO	Página
1	Cuadro de correlaciones entre la calidad nutricional de la mezcla ensilada y calidad de la fibra y los parámetros de fermentación ruminal.	49

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la producción *in vitro* de CH₄ y parámetros ruminales a partir de dos especies de leguminosas: Poró (*Erythrina poeppigiana*) y Cratylia (*Cratylia argentea*), ambos a 75 días de cosecha; y cuatro niveles de guineo cuadrado (*Musa acuminata x balbisiana*, Grupo ABB): 0, 15, 30 y 45% p/p en base fresca. Además, a todos los tratamientos se les adicionó un único nivel de melaza (5%) y de inóculo bacterial a razón de 1 l/t de material, para un total de 8 tratamientos. Cada tratamiento fue repetido 4 veces para un total de 32 microsilos de bolsa. Todos los análisis fueron realizados en el departamento de bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica en el año 2016. En esta investigación se determinaron variables nutricionales como el contenido de almidón, pectinas, fibra detergente neutro digestible e indigestible, así como variables de fermentación ruminal como el metano, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato), como también la relación acetato:propionato. De igual forma se determinaron todas las correlaciones entre las variables. En el caso del almidón, el ensilado de Cratylia mostró diferencias significativas entre los distintos niveles de inclusión de guineo cuadrado, mientras que para las pectinas no hubo diferencias, pero el Poró si mostró diferencias entre el tratamiento que solo contenía la leguminosa en relación a los otros niveles con guineo cuadrado. Por su parte la iFDN disminuyó conforme aumentó el nivel de inclusión de guineo cuadrado y la dFDN aumentó de manera inversamente proporcional. En cuanto a las variables de fermentación ruminal, el nitrógeno amoniacal obtenido estuvo dentro de los parámetros óptimos reportados por la literatura (50-200 mg/l), en dietas con almidón. Se encontró una correlación media y positiva (0,51) con relación a la PC y media y negativa (-0,45) en relación al TND. Por último, si se encontró diferencias significativas entre el CH₄ y el tipo de leguminosas, mas no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de inclusión del Guineo Cuadrado. Se encontraron correlaciones de -0,58 entre CH₄ y el ácido propiónico y

de 0,65 entre CH₄ y ácido acético. El almidón y las pectinas tuvieron correlaciones con el CH₄ de -0,53 y -0,54, respectivamente. En la simulación realizada, se utilizó consumos de 5, 10, 15 y 20 kilos de ensilaje/vaca/día. A estos consumos, se les determinó la materia seca y en base a esta, se calculó el potencial de producción de leche (kg/vaca/día) según el consumo de ensilado. Por otra parte se elaboró una simulación a partir de una novilla de 290 kg de PV, que consume 8,1 kg de MS de *Brachiaria decumbens* cv Basilisk y produce 141 L CH₄ por día. Se utilizó 4 relaciones de pasto: ensilado (80:20, 70:30, 60:40 y 50:50) y se observó que en la mayoría de los tratamientos, a menor relación pasto: ensilado, hay una menor producción de CH₄

INTRODUCCION

Debido al calentamiento global, las industrias, y en especial las agropecuarias, se han visto obligadas a buscar alternativas de producción que les permitan disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Los principales gases son el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O), cuyo potencial de calentamiento es de 1, 21 y 310, respectivamente, en un horizonte de tiempo de 100 años (IPCC, 2007).

Estos gases representan menos del 1% del total de los gases en la capa atmosférica y son los que se encargan de absorber la irradiación infrarroja que emite la superficie terrestre lo cual permite conocer la tierra como lo es hoy (IPCC, 1997), sin embargo, cuando se acumula gran cantidad de estos gases en la atmósfera la temperatura empieza a incrementar, lo cual trae como consecuencia la modificación climática, provocando diversos problemas como el cambio de los hábitats y el descongelamiento de los polos, entre otros (de Blas et al. 2008).

En Costa Rica, la principal fuente de alimentación de los rumiantes son los forrajes, esto debido al bajo costo que representa el mantenimiento y producción del mismo (Sánchez, 2007). Es por esta razón que las dietas en general tienen altos contenidos de celulosa, la cual es desdoblada por diversas bacterias del rumen, lo que permite un mayor aprovechamiento de los nutrientes. Sin embargo, en ese proceso se produce hidrógeno, gas expulsado con ayuda de las bacterias metanogénicas (Berra y Finster, 2002); razón por la que se afirma que a menor digestibilidad de la fibra existe una mayor producción de CH_4 (Calsamiglia, 2012), y por consiguiente un aumento en la pérdida de energía por medio de los eructos y lo que se desecha en las excretas (Carmona et al. 2005).

Actualmente, existe una necesidad de desarrollar metodologías zootécnicas que permitan producir la menor cantidad de GEI, principalmente CH_4 , con el fin de hacer más eficientes los sistemas productivos, tanto en la utilización de productos

como en la producción de los mismos, y de igual forma ir de la mano con las políticas del país, las cuales se basan en la conservación ambiental.

Según Carmona et al. (2005), el uso de leguminosas disminuye la producción de CH_4 , ya que aportan una mayor cantidad de nutrientes, debido a la reducción de componentes nitrogenados. Estos compuestos compiten con la reducción de sustratos, favoreciendo la producción de amonio (NH_4^+) y disminuyendo las emisiones de CH_4 entérico (Relling y Matioli, 2003). Por su parte a los taninos presentes en algunas leguminosas se les atribuye la baja en la producción de CH_4 , ya que estos se acomplejan con la proteína logrando obtener mayor proteína de sobrepaso y por ende menor producción de H_2 en el rumen (Bernal et al. 2008).

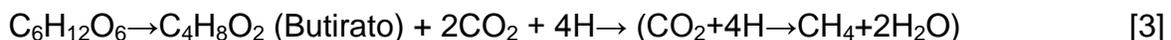
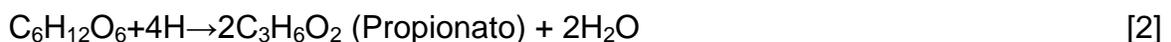
Asimismo, la reducción del tamaño de partícula, así como alimentos con contenidos altos de almidón, disminuye la producción de este gas ya que aumenta la digestibilidad de los nutrientes. El almidón además de esto, favorece la producción de ácido propiónico, disminuyendo los H^+ libres que son expulsados como CH_4 (Relling y Matioli, 2003). Por su parte, los ensilajes favorecen la degradación de la materia orgánica, la proteína cruda (PC) y la fibra, lo que disminuye la producción tanto de CH_4 como de NH_4^+ .

Debido a la falta de información acerca de técnicas zootécnicas para la mitigación de CH_4 entérico en rumiantes en Costa Rica, se propone la realización de este proyecto, el cual pretende generar una alternativa nutricional de fácil elaboración, con materias primas de bajo costo y adaptadas al país, con el fin de brindarle opciones a los productores para disminuir el impacto ambiental de cada explotación.

REVISIÓN DE LITERATURA

La producción de CH₄ entérico constituye una pérdida energética para el rumiante, que representa entre el 2 y el 12% de la energía bruta consumida (Vargas et al., 2012). Este gas es el producto de la fermentación anaeróbica que se obtiene como resultado de la interacción simbiótica de múltiples microorganismos que se encuentran en el tracto digestivo de los rumiantes (Van Soest, 1994).

La microbiota ruminal metaboliza los carbohidratos de la dieta convirtiéndolos en ácidos grasos volátiles, principalmente ácido acético, propiónico y butírico, aunque se producen otros. En las reacciones 1 y 3, se aprecian los procesos de síntesis de los ácidos acético y butírico. En estas reacciones se producen moléculas de H₂, las cuales deben ser retiradas para mantener la eficiencia energética durante el proceso antes mencionado; mientras que la reacción 2 muestra que la síntesis de ácido propiónico no es precursora para la síntesis de CH₄, sino por el contrario, compite por H₂ con la metanogénesis (Vargas et al. 2012).



Procesos de remoción de H⁺

La biohidrogenación de ácidos grasos insaturados, así como la síntesis de ácido propiónico y de CH₄ son una vía de remoción de hidrógeno en el rumen (Van Soest, 1994). La metanogénesis, vía más importante de remoción de hidrógeno, es realizada por un grupo de microorganismos llamados *Archaea*. Los

principales *Archea* del rumen son *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile*, y se encargan de reducir el CO₂, usando el hidrógeno como su fuente de energía (Attwood y McSweeney, 2008). Estas bacterias viven de manera libre o adheridas a los protozoarios dentro del retículo-rumen (Duncan, 2014).

La emisión de CH₄ entérico es afectada por múltiples factores como la cantidad de forraje en la dieta, la especie de forraje, la digestibilidad de la dieta, las materias primas utilizadas para la elaboración de los alimentos balanceados, entre otras (Vargas et al. 2012). Se conoce con certeza que las gramíneas C3 producen menos CH₄ que las C4 (Archimède et al. 2011), y esto está relacionado directamente con la mayor digestibilidad de los C3 por su diferencia fisiológica en relación a los C4.

Por otra parte, Kamra et al. (2010) sugieren que las plantas C4 favorecen la producción de CH₄ por su contenido de lignina, al igual que por los carbohidratos estructurales, los cuales aumentan la fibra detergente neutra (FDN). La FDN a su vez disminuye el consumo y la tasa de pasaje, favoreciendo así el llenado físico sobre el químico (Archimède et al. 2011); esto conlleva a una mayor ineficiencia productiva en comparación con explotaciones donde se alimenta con plantas C3.

Otro factor que afecta la producción de CH₄ es la composición nutricional de la dieta ofrecida a los animales. En un estudio realizado por Lovett et al. (2005), los animales alimentados con raciones con un alto porcentaje de almidones presentaron una disminución proporcional en la producción de CH₄. Este mismo comportamiento de la producción de CH₄ se observó en raciones con un alto contenido de proteína (Vargas et al. 2012).

Según Willén (2011), al utilizar dietas altas en proteína y almidón se disminuye la producción de CH₄ entérico. Considerando que si se aumenta la productividad por animal, se puede producir la misma cantidad de leche con una menor cantidad de animales y se va a generar una menor producción de CH₄ por

kilo de leche producido, porque todos los animales tienen semejantes requerimientos de mantenimiento, lo que permitiría un menor gasto en requerimientos de mantenimiento y una mayor inversión en producción de leche.

Se observó en múltiples estudios que al incorporar leguminosas a la ración, en dietas que eran a base de gramíneas, se disminuía la emisión de CH₄ entérico. Esto fue asociado a una mayor digestibilidad de las leguminosas, al aumento en la tasa de pasaje, a una reducción del pH, a un aumento en la relación de propionato:acetato en el rumen y a una menor cantidad de fibra presente en raciones mezcladas con leguminosas (Makkar et al. 1996).

Además las leguminosas poseen taninos, tanto condensados como hidrolizados (Lasa et al. 2010). Estos taninos pueden ligarse tanto a carbohidratos como a la proteína, lo que resulta en mayor cantidad de proteína y carbohidratos de sobrepaso, lo cual afecta negativamente las poblaciones de protozoarios y bacterias en el rumen, y por consiguiente se da una reducción en la producción de CH₄ (Lasa et al. 2010). Las leguminosas también pueden tener saponinas, las cuales son glucósidos de alto peso molecular, los que disminuyen la producción de CH₄ debido a la interacción que tienen con los protozoarios (Vargas et al. 2012).

En el caso de los carbohidratos, estos son el principal depósito de energía de los forrajes (50-80% MS). Se clasifican principalmente en 3 grupos: azúcares, oligosacáridos y polisacáridos. Los azúcares están constituidos por los monosacáridos, disacáridos y polialcoholes. El segundo grupo abarca los α -glucanos y α -galactósido, mientras que el almidón y no almidonados son los principales componentes de los polisacáridos (Hernández, 2010).

El metabolismo de los carbohidratos en el rumen se da por medio de la degradación y fermentación de sus formas más complejas. A estos se les fijan los microorganismos para provocar la disociación de la matriz celular, seguido por la

hidrólisis de los polisacáridos liberados del proceso anterior, convirtiéndolos en sacáridos, y por su fermentación intracelular. Este proceso tiene como resultado la producción de los ácidos grasos volátiles (AGV). Los microorganismos actúan sobre estos AGV y los transforman en distintos productos finales de la fermentación ruminal mediante las distintas vías metabólicas (Blanco, 1999).

La pared celular está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es la sustancia más abundante en la pared celular que, en condiciones normales, puede absorber grandes volúmenes de agua; es un material fibroso e insoluble en agua, con poca degradación por parte de las bacterias, y se encuentra principalmente en las hojas y tallo. La hemicelulosa, en el caso de los rumiantes, es más digestible que la celulosa; está presente en cualquier tejido vegetal, es parte estructural de la pared celular y es soluble en agua. La lignina aporta rigidez a la pared celular y limita la disponibilidad de carbohidratos estructurales para la microbiota ruminal. Se encuentra en las partes leñosas, partes fibrosas de la raíz, tallo y hojas principalmente, y su proporción aumenta con la edad fenológica (Hernández, 2010).

La lignina es el principal factor que afecta la digestibilidad de las materias primas, provocando un incremento en la FDN. Esto produce un llenado físico debido a una disminución en la tasa de pasaje, y por ende una posible disminución en la producción. La lignina no contiene ningún valor nutricional y no es un carbohidrato, pero se asocia con la celulosa y la hemicelulosa, afectando de manera directa la digestibilidad, y por consiguiente el aprovechamiento de estos (Palladino et al. 2006).

Los carbohidratos solubles o no estructurales comprenden azúcares, almidones y pectinas. Los azúcares funcionan como energía inmediata para el animal, mientras que los almidones y las pectinas sirven como energía inmediata para las bacterias ruminales, funcionando como energía de reserva debido a que su fermentación es más lenta que la de los azúcares, y equivale de un 30 a un

45% de la materia seca (MS) total (Gasque, 2008). Las pectinas equivalen al 10% de la pared celular y es la parte 98% soluble (Blanco, 1999). Su proceso fermentativo no disminuye el pH del rumen, ya que las bacterias que se encargan de su degradación son sensibles a pH bajo, por lo que su utilización se considera una práctica segura para el aporte de energía a los animales, aunque estas aumentan la producción de CH₄ (Bach y Calsamiglia, 2006).

El almidón se encuentra en diversos granos y tubérculos que son utilizados en la alimentación animal. Los granos poseen entre un 57 y un 77% (MS) de almidón, mientras que en los tubérculos este rango es más amplio (Knowles, 2012). Según Knowles (2012), la yuca tiene valores entre 72,9 y 87,8 % de la MS, mientras que Espín et al. (2001) reportan valores de varios tubérculos utilizados en las zonas andinas de Ecuador como la jícama (*Pachyrhizus erosus*), zanahoria, achira (*Canna indica*) y miso (*Mirabilis expansa*) que van desde el 0,56 al 72,18%. Por otra parte Hasbún et al. (2009) reportan datos de las 4 variedades de papas utilizadas en Costa Rica que van desde 13,4 al 20,8% de almidón.

El almidón está formado principalmente por amilosa, la cual es un polisacárido de cadenas lineales de glucosa y amilopectina, que tiene ramificaciones (Muñoz, 2005). A la hora que estos ingresan, son atacados en primera instancia por las bacterias amilolíticas que lo desdoblan para consumir glucosa y producir AGV, especialmente propionato. La digestibilidad en rumen depende de la accesibilidad que tengan las bacterias amilolíticas a estos (Relling y Matioli, 2003).

Según Relling y Matioli (2003), las dietas con suplementación de almidón son más eficientes a nivel energético, ya que se disminuye la pérdida por la producción de CH₄, y se asocia a un posible incremento en la digestión celulolítica de la fibra, con niveles de inclusión entre el 30 y el 35% de la MS de la dieta. En dietas de rumiantes, los almidones bajan el pH, lo cual puede ser contraproducente si se realiza de manera abrupta, ya que va a generar un

incremento de las bacterias lactogénicas, las cuales son las precursoras del lactato, y por ende, va a producir acidosis ruminal, por lo que se requiere de un cambio paulatino de la dieta que toma entre 7 a 14 días (Bonilla y Lemus, 2012).

Proceso de ensilaje

En la actualidad los ensilajes han tomado gran importancia, ya que el cambio climático ha provocado escasez de fuentes de alimento para los bovinos en ciertos periodos del año, lo que ha obligado a los productores a emplear esta y otras técnicas de conservación de alimento para esos periodos. Esta técnica consiste en un proceso de fermentación anaeróbica de carbohidratos solubles que se realiza a diversas materias primas para producir ácido láctico (Garcés et al. 2004), y permite que la calidad nutricional del material conservado no tenga grandes pérdidas, obteniendo alimentos de buena calidad en periodos donde la disponibilidad de pasturas es baja o nula al igual que en periodos donde la calidad del pasto disminuye. De igual forma, se puede utilizar como una técnica para aumentar carga animal o para sustituir el concentrado, entre otras.

Según Garcés et al. (2004), este proceso se divide principalmente en 4 etapas. La primera consiste en la fase anaeróbica, donde se da una pérdida del oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal, como resultado de la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como las levaduras y enterobacterias. De igual forma, se produce actividad por parte de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6,5 – 6,0). Las levaduras en medio anaeróbico se encargan de la fermentación de los azúcares dando como producto el CO₂ y el etanol.

La segunda fase es la fermentativa, la cual inicia cuando todo el oxígeno se ha consumido y se presentan las condiciones anaeróbicas. Esta fase puede tardar entre días y semanas, según sea el material a ensilar, al igual que de las

condiciones ambientales que se presenten al momento de realizar el ensilaje. El pH que se desea en esta etapa va desde 3,8 a 5,0 y se busca la colonización de las bacterias epifíticas de ácido láctico (Garcés et al. 2004).

Las características que presenta el cultivo, como contenido de azúcares, contenido de MS y composición de los azúcares, combinados con las propiedades del grupo de las Bacterias Productoras de Ácido Láctico (BPAL), su tolerancia a condiciones ácidas y el uso del sustrato influyen sobre la capacidad de competencia de la flora BPAL con las enterobacterias durante la fermentación del ensilaje (Garcés et al. 2004).

La fase estable es la tercera de las fases. En esta, las poblaciones de microorganismos presentes en la fase fermentativa empiezan a disminuir y las poblaciones resistentes que sobreviven se mantienen inactivas o activas a un ritmo menor. Por último, está la fase de apertura del silo, la cual se presenta al momento de abrir el ensilaje y exponerlo al aire. Este proceso se puede dividir en dos etapas, la primera asociada al proceso de degradación de los ácidos orgánicos, el cual aumenta el pH del silo, y da inicio a la segunda etapa, en donde se presenta un aumento en la temperatura y en la actividad de los microorganismos que deterioran el ensilaje (Garcés et al. 2004).

Esta técnica de conservación no solo ayuda a alimentar animales en épocas de sequía, sino que también puede ser utilizada como técnica para la mitigación de las emisiones de CH₄ entérico. Según Aguiar y Rojas (2014), a mayor edad de cosecha del maíz para ensilaje, se da una mayor producción de almidón y una disminución en la fibra lo que da como resultado una disminución en la relación CH₄: consumo de MS en novillos de engorde.

De igual forma, Estrada et al. (2015) indican que en la utilización de ensilajes, tanto de maíz como de cerdaza, se da una disminución de la emisión de CH₄ entérico. Esto se le atribuye al aumento en la digestibilidad del alimento, a la disminución en la fibra y por ser materiales energéticos, lo que propicia la

producción de ácido propiónico. En este proceso no se libera H^+ , lo cual disminuye el proceso de metanogénesis; y por el contrario, al aumentar la producción de ácido acético, se una mayor liberación de H^+ lo que favorece el proceso de metanogénesis.

Caracterización de algunas materias primas utilizadas en la elaboración de silos

Como se observa en el Cuadro 1, la *Cratylia* (*Cratylia argentea*) y el Poró (*Erythrina poeppigiana*) son las dos leguminosas que se utilizaron para la elaboración de los silos, estos aportan un alto contenido de proteína, la cual, como se ha mencionado anteriormente, es utilizado como una técnica para la mitigación de CH_4 entérico en bovinos. Por otro lado, el porcentaje de Fibra Detergente Ácido (FDA) es bastante bajo lo que disminuye la cantidad de fibra en la dieta, siendo esta otra técnica de mitigación. Estas las convierten en materias primas idóneas para la alimentación de rumiantes tanto para nutrirlos como técnica para la mitigación de CH_4 entérico y se puede utilizar en fresco cosechado por los animales, en canoa al igual que ensilado.

Cuadro 1. Análisis nutricional de las materias primas utilizadas en la elaboración de silos en el presente ensayo.

Composición	Cratylia	Poró	Guineo Cuadrado¹
MS (%)	24,4	25,0	28,0
PC (%)	15,4	16,8	3,9
FDN (%)	56,1	47,7	8,9
FDA (%)	39,3	31,1	5,7
DIVMS (%)	50,3	73,4	-
CNF (%)	13,3	21,9	80,7

Adaptado de López (2012) y López y Briceño (2016).

Uso de Cratylia y Poró

Pezo e Ibrahim (1999) proponen el uso de sistemas silvopastoriles con leguminosas, ya sea como banco de proteína o como cerca viva, con el fin de disminuir la utilización de concentrados. Aunque por otra parte, Tobía et al. (2004) indican que estos materiales pueden ser utilizados también como monocultivos o asociados para la elaboración de ensilajes.

En clima tropical, como el que presenta Costa Rica, tanto la Cratylia como el Poró, resultan alternativas viables para la alimentación o suplementación de bovinos tanto de producción cárnica como láctea. Esto por su fácil adaptabilidad a condiciones de baja fertilidad de los suelos ácidos, facilidad de siembra, fácil propagación, resistencia a condiciones adversas y gran cantidad de rebrotes (Camero, 1994, Hess et al., 1998).

¹ Comunicación personal M.Sc. Augusto Rojas. Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica.

Uso de Musáceas

En regiones tropicales existe un potencial para la producción de biomasa vegetal, ya que los suelos permiten desarrollar especies enfocadas en la acumulación de energía como lo son el banano, la caña de azúcar, la yuca, entre otras (de la Cruz y Gutiérrez, 2006). El banano que se utiliza en la alimentación animal principalmente es el de descarte, puede ser verde o maduro, al igual que puede ser utilizada solo la cáscara. Se puede brindar en fresco o ensilado (UPEB, 1978).

El guineo cuadrado se torna una opción viable para la alimentación de ganado, ya que se adapta en la mayoría del territorio nacional y es relativamente fácil de producir. Teniendo un rendimiento de aproximadamente 30.000 kg MS/ha en fruto y un total de nutrientes digestibles (TDN) de 60,91% (López, 2015). Este se considera un alimento energético por su alto contenido de almidón, el cual va a funcionar como precursor del ácido propiónico y ayuda en la mitigación de CH₄.

Como se observa en el Cuadro 1, los porcentajes de FDA y de FDN del fruto del guineo cuadrado son bajos y no van a afectar con un posible llenado físico. Por otra parte, se observa que el principal limitante es el aporte de proteína (3,9%) por lo que se torna vital utilizarlo en conjunto con algún otro material que brinde la proteína necesaria. El porcentaje de humedad va a ser otro limitante ya que, como en toda zona tropical, los materiales tienen poca materia seca (MS) por lo que se podría decir que si se realiza un proceso de ensilaje, el porcentaje de MS va a aumentar, lo que podría beneficiar a los animales.

Técnicas de medición de CH₄

Según Carmona et al. (2005) existen diversas técnicas para calcular la cantidad de CH₄ producido por los animales:

- **Técnica Cerrada:** Las técnicas calorimétricas de respiración tales como las cámaras cerradas, cajas en la cabeza y máscaras faciales son utilizadas para determinar las emisiones por la medición del flujo total de aire por alguno de los sistemas antes mencionados y la diferencia en la concentración entre el aire inspirado y expirado. La ventaja que presenta esta metodología es que mide, adicional al CH₄ producido en la rumia, el del tracto posterior, y la principal limitante es el alto costo de construcción y mantenimiento.
- **Técnicas con trazadores:** los métodos con isótopos involucran el uso de [3H] CH₄ o [14C-] CH₄ y animales fistulados. El mayor limitante en esta técnica es en la preparación de la solución por la baja solubilidad del CH₄. La principal ventaja es que no limita al animal en su comportamiento normal en pastoreo.
- **Ecuación de predicción:** permite calcular las emisiones de CH₄ a través de la distribución molar de los ácidos grasos volátiles (AGV). Esta metodología asume que todo el exceso de H₂ es convertido en CH₄ y no hay hidrógeno asociado con la síntesis de células microbiales. Existen múltiples ecuaciones de predicción postuladas por diversos autores.
- **Métodos fermentativos *in vitro*:** la principal ventaja de este método es su efectividad y eficacia por su rapidez y bajo costo de operación. Otra ventaja importante es que se pueden definir factores específicos, que en condiciones *in vivo*, pueden ocultarse por una gran complejidad de factores.

Dentro de esta técnica se puede utilizar el método del rumen artificial (Rusitec) la cual permite una mayor similitud a las condiciones del ecosistema ruminal. Este instrumento posee varias modificaciones que se han realizado a lo largo de los años con el fin de buscar mayor precisión. La principal desventaja de la técnica *in vitro*, consiste en que no hay una metodología específica sino que varía dependiendo del equipo que se disponga.

Objetivos

a. General:

- Determinar la producción *in vitro* de CH₄ y parámetros ruminales a partir de mezclas ensiladas de Cratylia (*Cratylia argentea*), Poró (*Erythrina poeppigiana*) y guineo cuadrado (*Musa acuminata* x *balbiana*, Grupo ABB).

b. Específicos:

- Determinar la concentración de fibra detergente neutro indigestible, almidón y pectinas en los materiales ensilados.
- Determinar la concentración de acetato, propionato y butirato producidos *in vitro* por los ensilados.
- Determinar la producción de CH₄ *in vitro* de los materiales ensilados analizados.
- Determinar la correlación entre los parámetros ruminales y la producción de CH₄ *in vitro*.
- Determinar las correlaciones entre los componentes nutricionales de los ensilados y la producción de CH₄
- Simular la emisión de metano entérico y potencial de producción de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los forrajes utilizados en el ensayo 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. La etapa 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 además se encuentran los laboratorios del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA), en los cuales se realizaron los análisis de características nutricionales y de parámetros químicos de las materias primas.

El experimento consistió de un arreglo factorial 4x2, donde se utilizaron dos especies de leguminosas: Poró (*Erythrina poeppigiana*) y Cratylia (*Cratylia argentea*), ambos con una edad de cosecha de 75 días; y 4 cuatro niveles de guineo cuadrado verde (*Musa acuminata x balbisiana*, Grupo ABB): 0, 15, 30 y 45% p/p. Además, a todos los tratamientos se les adicionó un único nivel de melaza (5%) y de inóculo bacterial (Microorganismos de Montaña [MM], elaborados de forma artesanal) a razón de 1 l/t de material, para un total de 8 tratamientos. Cada tratamiento fue repetido 4 veces para un total de 32 microsilos de bolsa.

Los microsilos fueron elaborados en bolsas plásticas para ensilaje, con una capacidad de 5 kg. Una vez depositado el material, se extrajo el aire mediante una bomba de succión o aspiradora. Posterior a la extracción del O₂, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se trasladaron a un laboratorio en San José, donde se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (25°C y 70% humedad relativa) durante 50 días. La composición nutricional de los tratamientos a evaluar se describe en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición nutricional del ensilaje de Cratylia y Poró con 4 niveles de inclusión de guineo cuadrado (0,15, 30, 45%).

Leguminosa	Cratylia				Poró				
	Guineo cuadrado	0	15	30	45	0	15	30	45
Materia seca (%)		32,2	28,6	29,2	27,5	21,9	24,1	23,8	23,6
Proteína cruda (% MS)		15,5	14,3	12,3	10,8	16,7	14,9	13,2	9,4
Extracto etéreo (% MS)		3,4	3,4	3,7	3,8	4,6	4,2	4,1	4,3
Cenizas (% MS)		8,2	7,8	7,8	7,3	10,9	8,5	8,0	7,2
FDN (% MS)		48,5	37,5	26,9	23,5	46,0	34,4	30,6	21,1
FDA (% MS)		31,7	24,2	17,0	14,6	33,8	24,7	21,6	14,4
Lignina (% MS)		10,8	8,5	6,8	5,7	11,0	8,1	7,2	4,7
CNF* (% MS)		25,2	36,9	49,2	54,6	21,8	37,9	44,0	57,9
EN _L (Mcal EN/kg MS)		1,47	1,66	1,85	1,92	1,41	1,65	1,73	1,92

Fuente: Montero (2016)

* CNF=carbohidratos no fibrosos.

Posterior a esto se tomaron muestras de cada tratamiento y se enviaron al Laboratorio de Bromatología de los Forrajes del CINA para conocer su composición nutricional. Esto formó parte de las actividades del proyecto de tesis de Montero (2016). Con esta información se correlacionaron los valores de composición nutricional con la producción *in vitro* de CH₄ obtenida en la presente investigación. La concentración de nutrientes de cada tratamiento se describe en el Cuadro 2.

Determinación de la fibra detergente neutro digestible e indigestible

A los 50 días de fermentación, se realizó la apertura de los microsilos. Estos fueron llevados al Laboratorio de Bromatología de Forrajes del CINA para determinar el contenido de fibra detergente neutro indigestible (inFDN) utilizando la ecuación de Detmann et al. (2004) y por diferencia se calculó la fibra detergente neutro digestible (dFDN).

Determinación de Almidón

Se determinó el contenido total de almidón esto mediante el método del Karkalas (1985), al cual se le tuvo que modificar adicionando una solución amortiguadora, ya que la enzima no trabaja a pH bajos como los presentes en los ensilados.

Determinación de Pectinas

Se determinó por medio del análisis gravimétrico de pectinas (Loyola et al. 2013).

Determinación de CH₄

Para la cuantificación de la emisión de CH₄ 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. Se colectó el gas de las botellas para medición de producción de gas (se colocó la muestra seca en las botellas para incubación, junto con 50 ml de licor ruminal. Estas botellas se dejaron 24 horas en incubación en baño María), directamente del septo, utilizando un tubo de vacutainer de 20 mL. Del mismo se tomó una submuestra de gas, el cual se analizó por medio de cromatografía de gases, utilizando un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies, modelo 7820^a, con una columna 19091P-MS4 y un detector de masas de simple cuadrupolo, modelo 5977E, de Agilent Technologies. La producción de CH₄ se expresó como litros de CH₄ por kilogramo de MS (L CH₄/kg MS) y como litros de CH₄ por kilogramo de MS digestible (L CH₄/kg MSD).

Determinación de AGV

A las 24 horas de incubación, y posterior a la toma de la muestra de gases, las botellas incubadas se retiraron de la incubadora, se trasvasó el medio de cultivo en tubos de ensayo, donde se le agregó 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se procedió a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 min para lograr la precipitación de la materia sin digerir. El supernatante se almacenó a 4-5 °C, para detener la fermentación en el licor ruminal y análisis de AGV. Para la determinación de los AGV se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) descrita por Ewen (2011), en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, con una columna Agilent Hi-Plex H.

Determinación de N amoniacal

Se tomó una muestra de 3 ml de los tubos de ensayo almacenados con ácido y en refrigeración, se les agregó 150µl de ácido tricloroacético. El contenido de N amoniacal se cuantificó por medio de la técnica de Kjeldahl (AOAC 1998).

Simulación de la emisión entérica

Se simularon las producciones de CH₄ tomando en cuenta 4 niveles de consumo de ensilaje (5, 10, 15, 20 kg de MF) así como la producción de leche en kg en base a estos consumos. Se multiplicó el consumo de ensilaje, por el contenido de MS de cada tratamiento y a estos se les multiplicó los litros de CH₄ producidos. En cuanto a la producción de leche, se determinó la MS y se multiplicó por la Energía Neta de lactancia (EN_L). Este resultado se dividió entre las Mcal necesarias para producir 1 kg de leche de 4% de grasa (0,75 Mcal) (NRC 2001).

Análisis de la información

Para el análisis de la información se utilizó un modelo de Análisis de Varianza de INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2013), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y_{ijk} = \mu + L_i + G_j + (L \times G)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y = es la variable de respuesta obtenida de la ecuación.

μ = es la media general

L = es el efecto i-ésimo de la leguminosa en los tratamientos.

G = es el efecto j-ésimo de la adición de guineo cuadrado en los tratamientos.

LxG = es el efecto ij-ésimo de la interacción entre la leguminosa y el guineo cuadrado

ε = Término de error, donde $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$

Se determinó la significancia de los efectos principales y la comparación entre medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05. Adicional a esto, se elaboraron las correlaciones de Pearson entre las variables de calidad nutricional presentadas por Montero (2016) y las variables determinadas en la presente investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad nutricional de las mezclas ensiladas y calidad de la fibra

Almidón

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de esta variable entre tipos de leguminosa (Cuadro 3). Por su parte, el contenido de almidón aumentó conforme aumentó el porcentaje de inclusión del guineo cuadrado, como se puede apreciar en el Figura 1. En el caso de la Cratylia si hubo diferencias significativas entre todos sus tratamientos mientras que, en el caso del Poró solo hubo diferencia entre el tratamiento con 0% de inclusión de guineo cuadrado y los demás tratamientos. Este comportamiento concuerda con lo reportado en la investigación de Benchaar et al. (2014) utilizando ensilados de maíz y de cebada, en donde al aumentar el nivel de ensilado de maíz aumenta el nivel de almidón de la dieta por ser una materia prima alta en este componente.

Cuadro 3. Contenido de almidón, pectinas y digestibilidad de la fibra de los tratamientos a 50 días de ensilaje.

Variable	Poró				Cratylia			
	% de Guineo Cuadrado				% de Guineo Cuadrado			
	0	15	30	45	0	15	30	45
Almidón (%MS)	2,2 ^b	3,3 ^c	4,0 ^c	4,8 ^c	0,1 ^a	1,4 ^b	2,3 ^c	6,6 ^d
Pectinas (%MS)	5,9 ^a	11,2 ^b	14,2 ^b	13,9 ^b	4,9 ^a	4,4 ^a	5,6 ^a	7,9 ^a
iFDN (%FDN)	26,5 ^c	19,4 ^b	17,3 ^b	11,3 ^a	25,9 ^c	20,5 ^b	15,3 ^a	13,7 ^a
dFDN (% FDN)	73,5 ^a	80,6 ^b	82,7 ^b	88,7 ^c	74,0 ^a	79,5 ^b	84,7 ^c	86,3 ^c

*iFDN= Fibra detergente neutro indigestible, dFDN= Fibra detergente neutro digestible
Letras distintas en la misma fila son diferentes ($p < 0,05$)

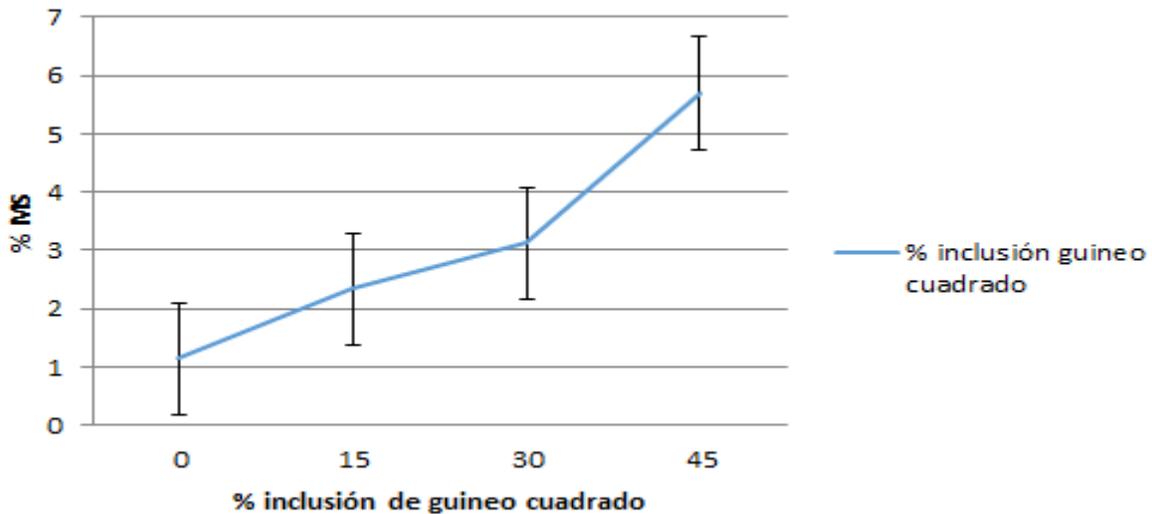


Figura 1. Promedios de concentración de almidón (%MS) en los tratamientos ensilados de acuerdo al nivel de inclusión de guineo cuadrado.

La diferencia en el efecto que tiene el guineo cuadrado entre los ensilados se asocia al contenido de almidón presente en las dos leguminosas, en donde el Poró tiene un nivel mayor de este (2,2%) mientras que la Cratylia tiene un nivel casi nulo del mismo (0,1%). Es por esta diferencia que en los tratamientos con esta segunda leguminosa, se observa una diferencia significativa entre todos los niveles de inclusión mientras que en el Poró la diferencia entre sus tratamientos es mínima.

También se determinó correlación entre la concentración del almidón y el contenido de dFDN (0,66), TDN (0,64) y carbohidratos no fibrosos ($\rho=0,66$). Por otra parte se encontró que el almidón tiene correlación alta y negativa con las variables FDN (-0,69) y FDA (-0,64), así como con la concentración de lignina (-0,66) encontrada por Montero (2016). Esto sugiere que una mayor concentración de almidón en el ensilado mejora la digestibilidad del material, lo que concuerda con lo encontrado por Montero (2016)

Los valores de concentración de almidón obtenidos en esta investigación fueron inferiores a los obtenidos por Mier (2009), con ensilados de maíz con

valores de 12,9%. Esto se puede deber al nivel de inclusión y que el ensilado es solo de maíz forrajero con alta proporción de mazorca, el cual, tiene un mayor contenido de almidón que el guineo cuadrado. Mientras que, los resultados de las correlaciones concuerdan con lo determinado en el estudio de Benchaar et al. (2014) donde al suplementar una dieta con 54% de ensilaje de maíz, el nivel de almidón en la dieta aumentó en casi un 10% en relación a la dieta con 54% de ensilaje de cebada, de igual forma obtuvieron casi 8% más de CNF entre estos tratamientos y una reducción del contenido de fibra por la sustitución de alimentos con mayor contenido de fibra por unos almidonados y más digestibles.

Pectinas

Entre la mayoría de los tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). En el caso de la especie de leguminosa, el promedio de los tratamientos con Poró presentó el doble de pectinas que el promedio de los tratamientos cuando se utilizó la Cratylia (11,3 y 5,8; respectivamente). Por su parte, el nivel de inclusión de guineo cuadrado (Cuadro 3) no mostró diferencias significativas entre los niveles de inclusión de guineo cuadrado. Esto puede deberse a la cantidad de pectina presente y disponible del guineo cuadrado (Figura 2).

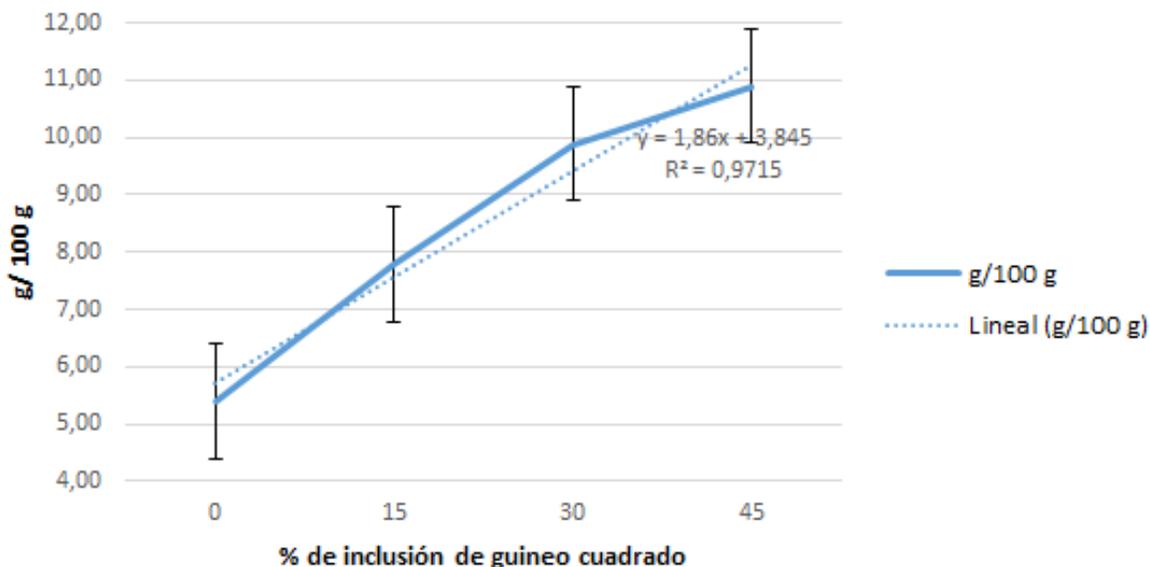


Figura 2. Promedios de concentración de pectinas (g/100 g) en los tratamientos ensilados de acuerdo al nivel de inclusión de guineo cuadrado.

En la presente investigación, las pectinas tuvieron una correlación moderada con los diferentes AGV, tanto positiva, como en el caso de ácido propiónico (0,53), como negativa con el ácido acético (-0,51) y butírico (-0,43); ácidos presentes en el licor ruminal. Bach y Calsamiglia (2006) indican que la rápida fermentación de las pectinas no disminuye el pH ruminal debido a que las bacterias degradadoras de pectinas son sensibles a pH ácidos, y es por esto que se considera seguro la utilización de estas para el aporte de energía. De igual forma, Zavaleta (1975) explica que las pectinas son degradadas por la enzima pectinesterasa la cual da como productos el metanol y el ácido péctico. Si el resultado es metanol, este puede ser convertido en metano, mientras que si es ácido péctico, los resultados pueden ser glucosa o ser degradada por la vía de la glucólisis, por lo tanto, no habría efecto sobre la producción de metano entérico.

Fibra Detergente Neutro Digestible (dFDN) e Indigestible (iFDN)

Como se observa en el Cuadro 3, la especie de leguminosa no tuvo ningún efecto sobre la digestibilidad de la fibra, al calcular los promedio en ambos casos

dieron resultados parecidos (dFDN: Cratylia=81,2, Poró= 81,4; iFDN: Cratylia= 18,9, Poró= 18,6). Por su parte, el nivel de inclusión de guineo cuadrado sí presentó diferencias significativas ($p < 0,05$), en donde a mayor inclusión de guineo, mayor es la dFDN (Figura 3) de la muestra y menor el iFDN. López y Briceño (2016) determinaron en Cratylia valores de FDN de 56,05 % MS con un 12,84 % MS de lignina, la cual si se utiliza la fórmula de Detmann et al. (2004), se obtiene un 30,81% de iFDN y un 69,18% de dFDN.

El comportamiento tanto del dFDN como del iFDN en el ensayo, es el esperado. Conforme se aumenta el nivel de inclusión de guineo cuadrado, el dFDN aumenta y el iFDN disminuye. Esto se asocia a la inclusión de una materia prima con menor contenido de lignina y la disminución de otra con un contenido de iFDN mayor. El factor primario que afecta la iFDN es el contenido de lignina, por lo que la edad de cosecha del material utilizado o el tipo de materias que se utilicen para la mezcla van a afectar directamente la digestibilidad de estas mezclas (López y Briceño, 2016; López-Herrera et al. 2017) y el aprovechamiento de los nutrientes ya sea de manera positiva o negativa según sean los contenidos de lignina de estos.

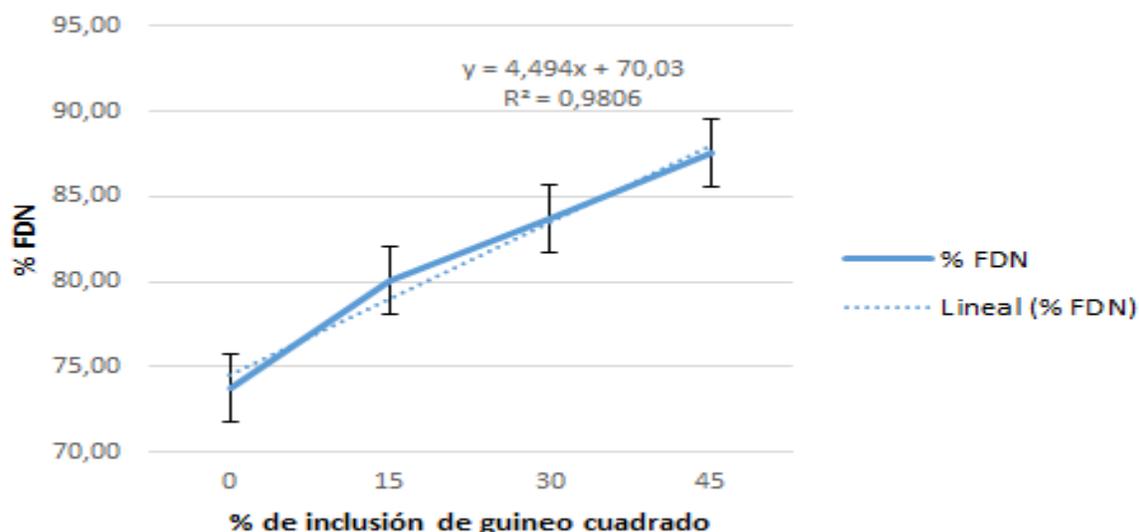


Figura 3. Contenido de Fibra Detergente Neutro Digestible (% FDN) presente en los diferentes silos según el nivel de inclusión de guineo cuadrado.

Parámetros de fermentación ruminal de las mezclas ensiladas

Nitrógeno Amoniacal

No hubo diferencias significativas en la producción de nitrógeno amoniacal entre especies de leguminosas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de inclusión del guineo cuadrado ($p < 0,05$) (Cuadro 4). La concentración más alta de NH_4 en licor ruminal, se detectó en el tratamiento con 0% de inclusión de guineo cuadrado, mientras que la menor concentración fue detectada en el tratamiento con 45% de inclusión de guineo cuadrado tal y como se observa en la Figura 4.

Cuadro 4. Contenido *in vitro* de las variables de la fermentación ruminal de los tratamientos a 50 días de ensilaje.

Variable	Poró				Cratylia			
	% de Guineo Cuadrado				% de Guineo Cuadrado			
	0	15	30	45	0	15	30	45
NH ₄ (mg NH ₄ /l fluido ruminal)	112 ^b	99 ^a	85 ^a	84 ^a	112 ^b	96 ^a	88 ^a	78 ^a
Á. Propiónico (moles/100 moles de AGV)	48,7 ^a	72,8 ^b	65,0 ^b	57,5 ^b	43,9 ^a	42,9 ^a	45,3 ^a	46,2 ^a
Á. Acético (moles/ 100 moles de AGV)	36,0 ^b	18,3 ^a	27,4 ^b	31,4 ^b	43,6 ^c	43,9 ^c	43,6 ^c	42,1 ^c
Relación Acetato:Propionato	0,8 ^b	0,3 ^a	0,4 ^a	0,6 ^a	1,1 ^b	1,1 ^b	0,9 ^b	0,9 ^b
Á. Butírico (moles/ 100 moles de AGV)	15,3	8,9	7,6	11,1	12,5	13,1	12,1	11,6
Litros CH ₄ /kg MS	4,8 ^a	2,4 ^a	2,9 ^a	4,5 ^a	18,0 ^b	15,9 ^b	12,5 ^b	9,7 ^b
Litros CH ₄ /kg MSD	7,7 ^a	3,3 ^a	3,8 ^a	5,4 ^a	27,5 ^b	22,1 ^b	15,5 ^b	11,6 ^b

Letras distintas en la misma fila son diferentes ($p < 0,05$) NH₄=nitrógeno amoniacal, CH₄=metano, MSD=materia seca digestible

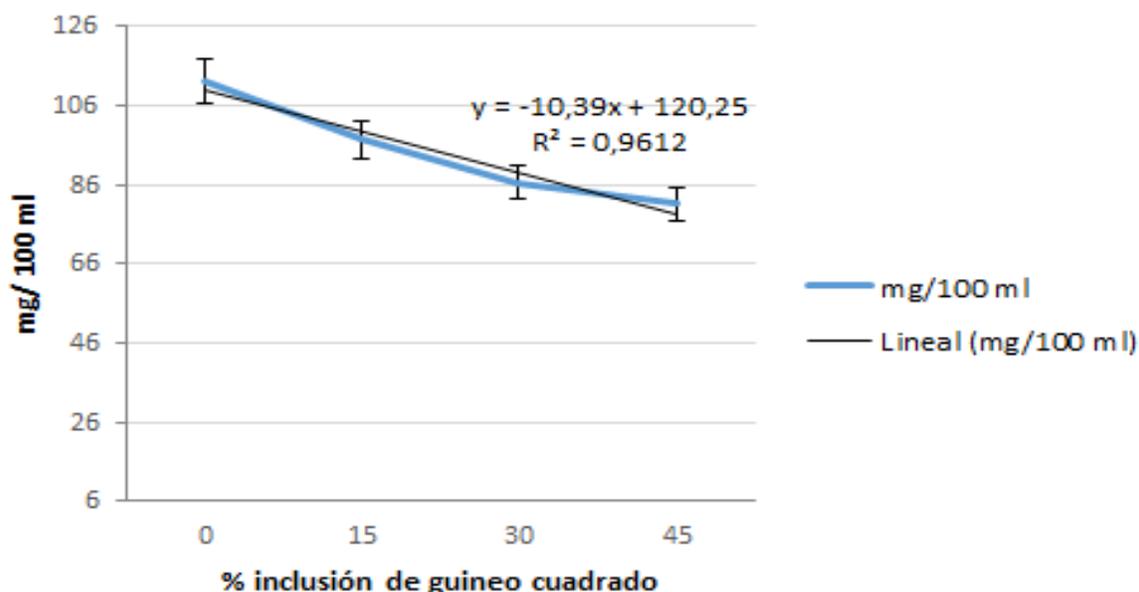


Figura 4. Concentración de nitrógeno amoniacal (mg NH₄/100 ml) en fluido ruminal generado por los tratamientos ensilados.

Los valores de NH_4 se reducen conforme se aumenta la cantidad de guineo cuadrado en la mezcla ensilada, esto puede ser provocado por un menor aporte de proteína, ya que Montero (2016) encontró que al utilizar más guineo cuadrado, se reduce en contenido de proteína en la mezcla (Cuadro 2); lo que supone una menor concentración de NH_4 en el licor ruminal.

En esta investigación se determinó una correlación media y positiva del NH_4 producido por el animal en relación con la proteína cruda (0,51) presente en la dieta; pero fue media y negativa en el caso de la relación entre el NH_4 y el TND (-0,45). Esto concuerda con lo encontrado por Hess et al. (1998) los cuales obtuvieron una correlación alta y positiva entre el nivel de NH_4 y el contenido de proteína cruda presente en la dieta, donde los resultados de los tratamientos con 4 niveles diferentes de inclusión de urea van desde 40,7 hasta 293,9 mg/l.

Aunque Rojas (2017)² menciona que en Costa Rica los valores óptimos de NH_4 en el rumen oscilan entre 150 y 200 mg/l, esto debido al alto contenido de FDN presente en las pasturas tropicales. Los tratamientos analizados muestran valores más similares a los valores reportados en los trabajos de Satter y Slyter, (1974) y Mehrez et al. (1977) (50 y 200 mg/l); esta variación se debe al contenido de carbohidratos en las dietas utilizadas por estos autores. También se ubican dentro del ámbito determinado por Hess et al. (1998), por lo que no se considera que el uso de estos materiales suponga un riesgo para la salud de los animales, tal y como indica Fernández (2016), quien expone que concentraciones altas (>250 mg/l) podrían predisponer a intoxicación en los animales.

La correlación negativa con el TND puede ser debida a un mayor aprovechamiento de los nutrientes, por lo cual hay una disminución de nitrógeno libre en el rumen para la formación de NH_4 . Otro factor que puede afectar los niveles de NH_4 en rumen, según Monsalve et al. (2006) es el nivel de taninos

² Comunicación personal M.Sc. Augusto Rojas. Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica.

presentes en las leguminosas, ya que en un estudio realizado con 4 tipos de leguminosas, en todos los casos, al compararlas con los grupos control, que consistían de gramíneas de baja PC y alto FDN y FDA, el nivel de NH_4 disminuyó.

Ácidos Grasos Volátiles

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la producción de ácido acético según la especie de leguminosa que se utilizó en la elaboración del ensilado. La *Cratylia* presentó un valor promedio de 43,1 moles/100 moles de AGV, y de 28,3 moles/100 moles de AGV en el caso del Poró, y en donde también se encontró diferencia significativa en el porcentaje de inclusión del guineo en donde solo el 15% de inclusión muestra una diferencia significativa a los demás porcentajes de inclusión, siendo este menor (Cuadro 4).

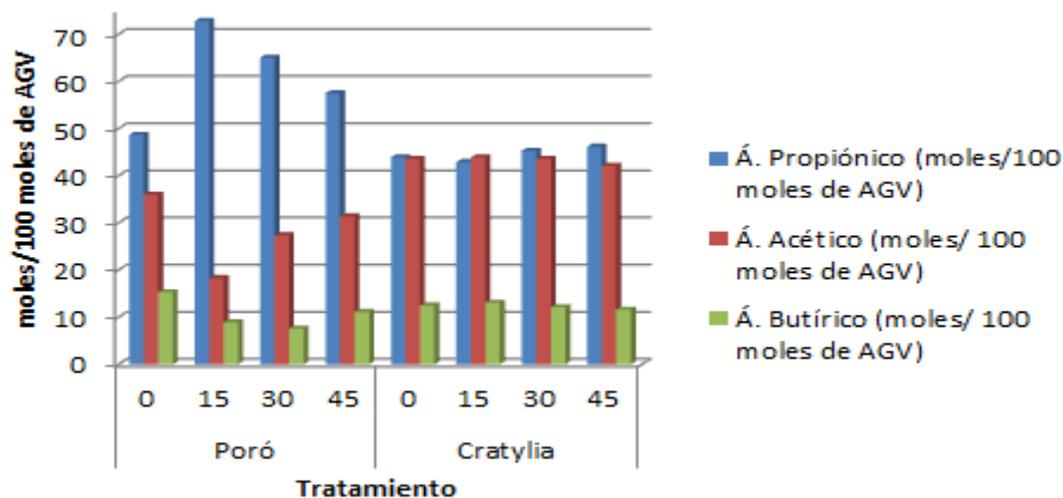


Figura 5. Concentración de los diferentes AGV determinados en el estudio.

Por su parte el ácido propiónico solo mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación con la especie de leguminosa que se utilice. Como se puede observar en la Figura 5, en promedio se encontró que los tratamientos con Poró producen mayor porcentaje de este ácido en relación a los tratamientos con *Cratylia* (61,0 moles/100 moles de AGV y 44,6 moles/100 moles de AGV,

respectivamente), esto se puede asociar al contenido de CNF presentes en esta leguminosa (21,9% MS) o con el contenido de taninos, los que pueden disminuir la digestión de la fibra.

El porcentaje de inclusión de guineo no mostró ninguna diferencia significativa, en relación con la producción de ácido butírico en ningún tratamiento ni en su interacción (Cuadro 4). Esto puede deberse a los contenidos de taninos presentes en las leguminosas, al alto contenido de CNF de los materiales utilizados o al tiempo de incubación utilizado en este estudio. Urquijo et al. (2012), indican que la fibra tarda entre 20 y 48 horas en ser degradada y podría no haber sido suficiente tiempo para lograr una colonización de la fibra, lo que aumentaría la concentración de acetato.

Entre los diferentes AGV, se encontraron correlaciones tanto altas y positivas, como en el caso del ácido acético con el butírico (0,62); como muy alta y negativas, en el caso del ácido acético con el ácido propiónico (-0,97) al igual que entre el ácido propiónico y el ácido butírico (-0,79). Estas correlaciones concuerdan con lo descrito por Zavaleta (1975) en donde indica que el contenido de acetato puede disminuir al incluir materiales con alto contenidos de almidón y por ende se puede dar un aumento de propionato o del butirato, mientras que si las dietas son a base de forraje de fibra larga se espera una disminución del propionato y un incremento del acetato.

Estas correlaciones se observaron en los estudios realizados por Benchaar et al. (2014) al igual que por Oba y Allen (2000), en donde al ofrecer dietas con mayor cantidad de almidón, y una menor cantidad de fibra, favorece la producción de ácido propiónico y una disminución del acético, que dieron como consecuencia un aumento en el volumen de producción y una disminución del porcentaje de grasa en leche que se asocia a una disminución en la cantidad de acetato en el rumen.

Las relaciones Acetato: Propionato obtenidas en este trabajo, fueron muy bajas (entre 0,3: 1 y 1,1: 1), las cuales son inferiores a las encontradas por Busquet et al. (2005) en donde encontraron relaciones de Acetato: Propionato entre 3:1 y 1:1 utilizando en la dieta 1 al grupo control, 2 niveles de inclusión de monensina, 2 niveles de inclusión de cinamaldehído y dos niveles de inclusión de extracto de ajo. Esto puede deberse a que Busquet et al. (2005) utilizaron una dieta base y se le agregaron los tratamientos, mientras que en este estudio, los tratamientos fungieron como dieta total. De igual forma Meale et al. (2012) encontraron una relación 3:1 en *Cratylia* no ensilada que sigue siendo superior al encontrado en esta investigación.

Rojas (1995) indica que una relación adecuada entre acetato: propionato es de 3,25:1 para mantener un alto contenido de grasa en la leche, mientras que los resultados obtenidos en esta investigación muestran como valores máximos una relación de 1,1:1 y como mínimo de 0,3:1. Estas relaciones tan bajas pueden traer consecuencias contraproducentes para la salud del animal como lo son la acidosis ruminal, timpanismo, entre otras (Zavaleta, 1975). Esto indica que estas mezclas no son aptas para ser utilizadas como dieta base, sino dentro de una dieta balanceada.

Metano

En cuanto a los litros de CH₄ producido en relación a los kg de MS consumidos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación al tipo de leguminosa que se utilizó. Se encontró una diferencia marcada, la cual favorece al Poró al producir en promedio 3,6 L CH₄/kg MS mientras que la *Cratylia* produjo 14,0 L CH₄/kg MS. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al nivel de inclusión de guineo cuadrado en la mezcla ensilada (Cuadro 4).

Cuando se consideran los litros de CH₄ producidos en relación al total de kg de materia seca digestible (MSD), el comportamiento cambia, ya que los litros de CH₄ producidos, según el tipo de leguminosa utilizada aumentan, pero mantienen la tendencia y las diferencias significativas entre ellos en donde la Cratylia aumentó a 19,2 l/kg MSD y el Poró pasó a 5,0 l/kg MSD.

Estas diferencias se pueden relacionar con el contenido de taninos condensados en las leguminosas, López-Herrera et al. (2017) determinó en un meta-análisis que en promedio la Cratylia posee 1,09% MS en taninos condensados mientras que el Poró tiene en promedio 3,35% MS. Archimède et al. (2015) determinaron que utilizar alimentos altos en taninos reduce la producción de metano lo cual puede deberse a la disminución en la digestión de la fibra, disminución de las bacterias celulolíticas y aminolíticas o alteración de la adherencia del sustrato por microbios fibrolíticos (Bento et al. 2005).

En relación con el nivel de inclusión de guineo cuadrado, no se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) (Cuadro 4). Como se puede observar en la Figura 6, a pesar de que entre los tratamientos no hay diferencia significativa, se puede observar en promedio una disminución en los litros de CH₄ producidos en relación a la MSD al igual que en relación a la MS.

Este comportamiento se puede deber a la baja relación acetato:propionato encontrada en este trabajo. Ya que estos niveles se encontraron por debajo de los niveles más bajos reportados como óptimos en la literatura. Se encontró una correlación alta y negativa (-0,61) entre el CH₄ y el ácido propiónico lo que justifica estos resultados. Se recomienda realizar más investigación sin tomar en cuenta estas raciones como raciones totales sino como parte de una dieta balanceada para poder determinar con mayor exactitud los alcances de esta estrategia alimenticia para la mitigación del CH₄ producido por los bovinos.

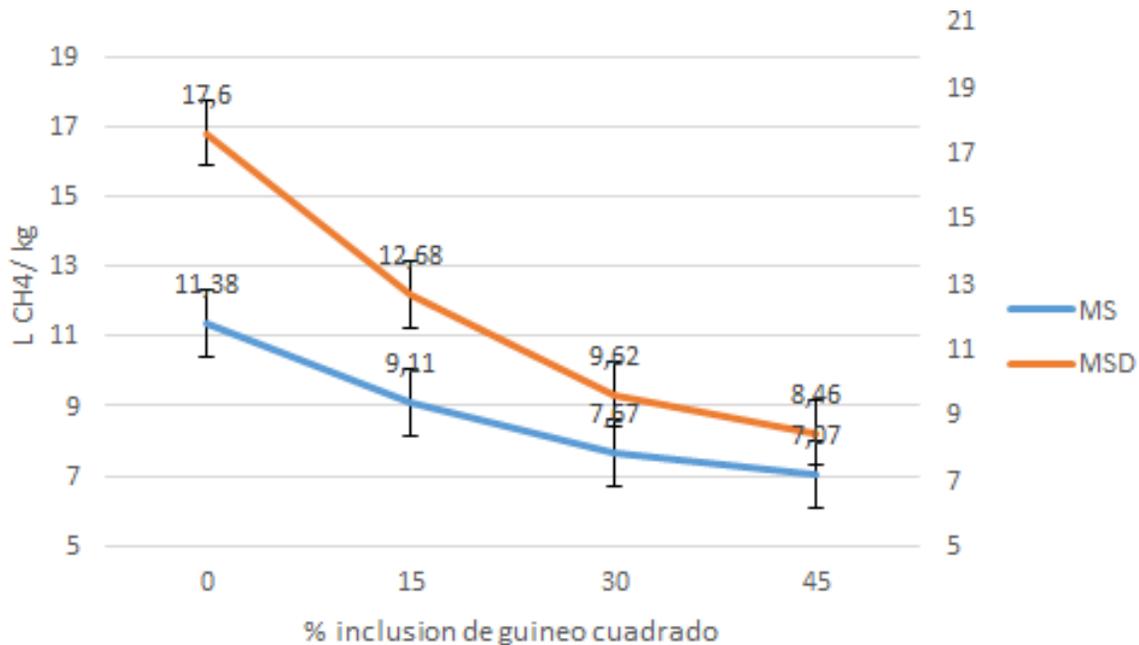


Figura 6. Producción *in vitro* de CH₄ (L CH₄/kg) tanto de MS como de MSD de los diferentes silos según el porcentaje de inclusión de guineo cuadrado.

Se encontró una correlación alta y positiva ($\rho=0,65$) entre el CH₄ y el ácido acético mientras que entre el CH₄ y el ácido propiónico (-0,58) la correlación fue alta y negativa en relación a la MSD. Este comportamiento se asemeja a lo encontrado por Benchaar et al. (2014) donde al disminuir el ácido acético y aumentar el ácido propiónico producido por un cambio en la alimentación al introducir leguminosas, se da una disminución de las emisiones de CH₄ por parte del animal.

Por otra parte, se determinó que tanto el nivel de almidón (-0,53) y pectinas (-0,54) presentes en la dieta, tienen una relación negativa y moderada con la producción de CH₄. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Lovett et al. (2005) en la que al utilizar dietas altas en almidones se observó una disminución en la producción de CH₄ entérico. Por su parte la correlación entre las pectinas y la producción de CH₄ puede deberse a que en este caso, como lo indica Zavaleta (1975), las pectinas degradadas por las enzimas pectinesterasas

se transformaron en ácido péctico y no en metanol. Se recomienda realizar más investigación sobre las posibles causas del porqué toma uno u otro camino de degradación o si el método que se utilizó para realizar este análisis influyó en algo.

Según Van Soest (1978), las materias primas que poseen altas concentraciones tanto de hemicelulosa como de celulosa y pectinas, favorecen el proceso de metanogénesis a nivel ruminal, ya que los componentes antes mencionados al ser colonizados presentan 2,8 veces más metanogénesis que la hemicelulosa y 6,75 veces mayor que los almidones (Czerkawski y Breckenridge, 1969, Hindrichsen et al. 2004). Este tipo de fibras fermentables se han vuelto muy utilizadas como fuente de energía en dietas de vacas lecheras (Firkins, 1997; Mansfield et al. 1994).

Simulación de la emisión de metano entérico

En una investigación realizada por Montenegro y Barrantes (2016), 4 novillas de 2 años de edad, (290 ± 16 kg), en pastoreo de *Brachiaria decumbens* cv Basilisk, sin fertilizante y a 35 días de rebrote consume en promedio 8,1 kg MS, lo que produce en promedio $17,5 \pm 0,7$ litros CH_4 / kg MS lo que en promedio representa 141 ± 16 litros CH_4 por animal por día. Utilizando esta dieta como base, se simularon 4 relaciones pasto: ensilado con el fin de determinar el posible impacto que puede tener la inclusión de estos ensilados en las emisiones de CH_4 .

Como se observa en el Cuadro 5, conforme se disminuye la relación pasto: ensilado, disminuye la emisión de CH_4 , con excepción del tratamiento de Cratylia con 0% de inclusión de guineo cuadrado, en donde a menor relación, mayor es la cantidad de CH_4 producido. Por otra parte el tratamiento con menor emisión de CH_4 fue el de Poró con 15% de inclusión de guineo cuadrado y el de mayor emisión fue el de Cratylia con 0% de inclusión. El comportamiento en los tratamientos de Cratylia, en donde a mayor inclusión de guineo y mayor sustitución, hay una menor producción de metano. Esto se puede asociar al bajo

contenido de almidón de la Cratylia el cual es casi nulo (0,1 %), por lo que al aumentar el nivel de inclusión de guineo, el contenido de almidón en el ensilado aumenta. De igual forma, a la hora de disminuir la relación pasto: ensilado, aumenta el contenido de almidón de la dieta lo que disminuye la emisión de CH₄.

Cuadro 5. Producción de CH₄ (L CH₄/animal/día) según las diferentes relaciones pasto: ensilado (% MS).

Leguminosa	Poró				Cratylia			
	0%	15%	30%	45%	0%	15%	30%	45%
Relación Pasto: ensilado (% MS)								
80:20	120,53	116,64	117,45	120,04	141,91	138,51	133,00	128,47
70:30	110,32	104,49	105,71	109,59	142,40	137,30	129,03	122,23
60:40	100,12	92,34	93,96	99,14	142,88	136,08	125,06	115,99
50:50	89,91	80,19	82,22	88,70	143,37	134,87	121,10	109,76

Se realizó otra simulación para determinar el potencial de producción de leche (kg) utilizando 4 niveles de inclusión de ensilado (5, 10, 15 y 20 kg MF). A estos valores se les determinó la materia seca y se multiplicó por la EN_L y esta se dividió entre 0,75 Mcal, las cuales son necesarias para producir 1 kg de leche con 4% de grasa (NRC, 2001).

Cuadro 6. Potencial de producción de leche (kg) según los kg de ensilaje consumido

Leguminosa	Cratylia				Poró			
	0%	15%	30%	45%	0%	15%	30%	45%
Consumo de Ensilaje (kg)								
5	3,2	3,2	3,6	3,5	2,1	2,7	2,7	3,0
10	6,3	6,3	7,2	7,1	4,1	5,3	5,5	6,1
15	9,5	9,5	10,8	10,6	6,2	8,0	8,2	9,1
20	12,6	12,7	14,4	14,1	8,3	10,6	11,0	12,1

Por su parte la producción de leche no tuvo diferencias entre los tratamientos pero, como se observa en el cuadro 6, parece haber una tendencia de incremento en la producción láctea conforme se aumentó el consumo de ensilaje. Estos resultados fueron superiores a los obtenidos por López y Briceño (2016) en el que utilizaron diversas edades de corte de *Cratylia* orgánica en donde obtuvieron producciones entre los 3,01 y 3,26 kg de leche/vaca/ día por cada 10 kg de materia fresca consumida. Por su parte López et al. (2015), con ensilados de piña con adición de heno y urea, determinaron producciones lácteas de entre 0,34 y 7,65 kg vaca/día. En otro trabajo, López et al. (2016) encontraron producciones de leche de entre 0,43 y 5,66 kg de leche/vaca/día dependiendo el nivel de consumo de materia fresca de diversos tratamientos de ensilados de corona de piña con pulpa de cítricos, heno y urea.

Comparando estos potenciales de producción lechera, se puede determinar que los ensilados elaborados en este trabajo pueden representar una opción viable y con mejores resultados productivos.

CONCLUSIONES

En el caso del almidón, se encontraron diferencias significativas entre las leguminosas, lo que indica que es importante conocer estas concentraciones previas a la mezcla con materiales que también posean niveles altos de almidón como lo es el guineo cuadrado. En el caso del Poró, no hubo diferencia significativa entre los niveles de inclusión de guineo cuadrado lo cual no hace esta mezcla tan recomendada si lo que se busca es aumentar la cantidad de almidón en la ración.

En relación a las pectinas presentes en los ensilados, en promedio el Poró tuvo el doble que la Cratyliá. El nivel de inclusión del guineo cuadrado no presentó diferencias significativas con la segunda pero si con la primera, en donde la presencia o no de este si representó una diferencia significativa.

Por su parte, los niveles de dFDN e iFDN resultaron inversamente proporcionales. En la mayoría de los tratamientos, al aumentar los niveles de inclusión de guineo cuadrado aumenta el dFDN y disminuye el iFDN de manera significativa, por lo que aumenta el aprovechamiento de los nutrientes presentes en la mezcla.

Los valores de nitrógeno amoniacal encontrados estuvieron dentro de los valores encontrados en la literatura en dietas con almidones, pero todos estuvieron por debajo de los reportados para maximizar la fermentación de la fibra.

La relación acetato: propionato en todos los tratamientos estuvieron por debajo del valor recomendado de 3,25:1, esto se pudo deber al tiempo de incubación de las muestras, que fue de 24 h, el cual pudo no ser el tiempo necesario para la colonización de la fibra la cual aumentaría la concentración de ácido acético presente en las muestras.

Existen diferencias entre las leguminosas utilizadas, presentando el Poró las menores producciones de CH₄ con relación a la Cratylia. Por otra parte, la inclusión de guineo cuadrado hasta 45% no altera la concentración de metano.

Con respecto a las simulaciones, se observó que la relación pasto: ensilado 50: 50, es la de menor producción de CH₄. De igual forma, las emisiones fueron menores en los tratamientos con Poró. Se encontró que al adicionar los ensilados en una dieta exclusiva de pasto, en la mayoría de los casos el metano entérico disminuyó, lo que indica que este tipo de estrategias son efectivas en la mitigación de metano en sistemas vacunos y brindan un beneficio en el potencial de producción láctea brindando no solo una alternativa ambiental, sino también, una alternativa productiva.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar estos ensilajes como parte de una dieta balanceada, para así determinar con mayor precisión los efectos de su interacción con otros ingredientes.

Evaluar el proceso de degradación de las pectinas, con el fin de determinar cuáles pueden ser los posibles causantes de que la pectina tome la vía del metanol o la del ácido péctico, para así determinar si la metodología de laboratorio puede o no interferir en el resultado.

Investigar sobre taninos presentes en gramíneas y leguminosas a nivel nacional, para así obtener valores más confiables para explicar con mayor precisión el comportamiento de estas en los animales de Costa Rica.

Evaluar la elaboración y conservación de ensilajes de mezclas en finca, al igual que una prueba de consumo y balanceo de dieta para un adecuado funcionamiento nutricional, productivo y económico.

Evaluar la producción de metano de los diferentes forrajes y leguminosas utilizadas para la alimentación animal, con el fin de brindar información a los productores para tener explotaciones con una mayor responsabilidad ambiental y productiva.

LITERATURA CONSULTADA

- Aguiar, E., Rojas, A. 2014. Métodos utilizados para reducir la producción de metano endógeno en rumiantes. Costa Rica. *Nutrición Animal Tropical*. 8 (2): 72-90 pp.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1996. Starch (Total) in Cereal Products. Amyloglucosidase- α -Amylase Method. AOAC International, USA.
- 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 pp.
- 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*.
- Attwood, G., McSweeney, C. 2008. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H₂ utilization in the rumen. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, (48): 28-37 pp.
- Bach, A., Calsamiglia, S. 2006. La fibra en los rumiantes ¿química o física? Grupo de investigación en nutrición, manejo y bienestar animal IRTA-Unidad de rumiantes. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 99-115 pp.
- Benchaar, C., Hassanat, F., Gervais, R., Chouinard, P. Y., Petit, H. V., & Massé, D. I. 2014. Methane production, digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and milk production of cows fed corn silage-or barley silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 961-974 pp.

- Bento, M. H. L.; Acamovic, T.; Makkar, H. P. S., 2005. The influence of tannin, pectin, and polyethylene glycol on attachment of ¹⁵N-labeled rumen microorganisms to cellulose. *Animal Feed Science and Technology* 122, 41–57.
- Bernal, L., Ávila, P., Ramírez, G., Lascano, C., Tiemann, T., Hess, H. 2008. Efecto del ensilaje y el heno de *Calliandra calothyrsus* y *Vigna unguiculata* sobre los parámetros de fermentación en el sistema Ruistec. *Asociación latinoamericana de producción animal*. Cali, Colombia. 16 (4): 187-191 pp.
- Berra, G., Finster, L. 2002. Emisión de gases de efecto invernadero; influencia de la ganadería argentina. Instituto de Patobiología, INTA cautelar. Argentina. 2 p.
- Blanco, M. 1999. El alimento y los procesos digestivos en el rumen. *Fisiología digestiva y manejo del alimento*. Sitio Argentino de Producción Animal. 1-10 pp.
- Bonilla, J., Lemus, C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 3 (2): 215-246 pp.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. y Kamel, C. 2005. Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 88: 2508-2516 pp.
- Camero, L. 1994. Poró (*Erythrina peopiggiana*) y Madero Negro (*Gliricidia sepium*) como suplementos proteicos en la producción de leche. *Revista Agroforestería en las Américas*. Turrialba, Cartago, Costa Rica. 6-8 pp

- Calsamiglia, S. 2012. La contribución del rumiante a la producción de gases de efecto invernadero: los puntos sobre las íes. Universidad técnica de Barcelona, Barcelona, España. 7 p.
- Carmona, J., Bolivar, D., Giraldo, L. 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 (1): 49-61 pp.
- Chandler, J. 1980. Predictin methane fermentation biodegradability. M. S. thesis. Cornell Univ, Ithaca, NY.
- Czerkawski, J. y 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 pp.
- De la Cruz, J. Gutierrez, G. 2006. Alimentación de bovinos con ensilado de mezclas de banano de rechazo y raquis en diferentes proporciones. *Revista Avances en Investigación Agropecuaria*. 10(3): 29-39 pp.
- de Blas, C., García, P., Cambra, M., Torres, A. 2008. Contribución de los rumiantes a las emisiones de gases con efecto invernadero. XXIV Curso de especialización FEDNA. 23-24 octubre. Madrid, España. 122 p.
- Detmann, E., J. Zervoudakis, L. da-Silva-Cabral, V. Rocha-Júnior, S.d.C. Valadares-Filho, A. de-Queiroz, N. Ponciano,. A. Fernandes. 2004. Validação de equações preditivas da fração indigestível da fibra em detergente neutro em gramíneas tropicais. *Rev. Bras. Zootec.* 33:1866-1875
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, Y.C. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA,

Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

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. 123 p

Espín, S., Brito, B., Villacrés, E., Rubio, A., Nieto, C., Grijalva, J. 2001. Composición química, valor nutricional, y usos potenciales de siete especies de raíces y tubérculos andinos. Acta Científica Ecuatoriana.1 (7): 54 p.

Estrada, J., Villa, N., Henao, F. 2015. Digestibilidad de un ensilaje de caña de azúcar con porcinoza y su evaluación en un sistema bovino de doble propósito. Colombia. Revista Pastos y Forrajes. 38 (4): 425-430 pp.

Ewen, A. 2011. Organic acids in silage: Application note. Agilent Technologies. Estados Unidos. 3p.

Fernández, A. 2016. Suplementación con nitrógeno no proteico en rumiante. Urea, características, fuentes y funciones. Nutrición de Bovinos. Argentina. 4-15 pp.

Firkins, J. 1997. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. Estados Unidos. Journal of Dairy Science. 80(7): 1426-1437 pp.

Garcés, A., Berrio, L., Ruiz, S., Serna, J., Builes, A. 2004. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. Revista Lasallista de investigación. Colombia. 1 (1): 66-71 pp.

Gasque, R. 2008. Enciclopedia Bovina. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. México. (1): 7-29 pp.

- Hasbún, J., Esquivel, P., Brenes, A., Alfaro, I. 2009. Propiedades físico-químicas y parámetros de calidad para uso industrial de cuatro variedades de papa. *Agronomía Costarricense*. 33 (1): 77-89 pp.
- Hess, H., Florez, H., González, E., Ávila, M. 1998. Efecto del nivel de nitrógeno amoniacal en el rumen sobre el consumo voluntario y la digestibilidad in situ de forrajes tropicales.
- Hernández, S. 2010. Importancia de la fibra en la alimentación de los bovinos. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 11-3 pp.
- 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 pp.
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático). 1997. Estabilización de los gases atmosféricos de efecto invernadero: implicaciones físicas, biológicas y socioeconómicas. Contribución al grupo de trabajo I. [Equipo de redacción principal: Houghton, J. Meira, G. Griggs, D. Maskell, K. (directores de la publicación)]. IPCC. Ginebra, Suiza, 8-35 pp.
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático). 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. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 p.

- Kamra, N., Agarwal, N., Chaudhary, L. 2010. Effect of tropical feeds and plants containing secondary metabolites on methane emission by ruminants. *Tropical Animal Health Production*, (1701): 1-23 pp.
- Karkalas, J. 1985. An improved enzymatic method for the determination of native and modified starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 1016.
- Knowles, M. 2012. Efecto de la fuente y el nivel de almidón en la dieta de vacas Holstein lactantes sobre la producción y el contenido de proteína en la leche. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de producción animal. Bogotá, Colombia. 1-75 pp.
- Lasa, J., Mantecón, C., Gómez, M. 2010. Utilización de taninos en dietas de rumiantes. Servicio de Rumiantes de Nuevas Tecnologías de Gestión Alimentaria, S.L. Sitio argentino de producción animal. Argentina. 1-3 pp
- López, M. 2012. Experiencias en la producción de alimentos orgánicos para animales de la zona Huetar Norte de Costa Rica. IV Congreso Sudamericano de Agronomía. Capítulo Ecuador. MAGAP. Congreso llevado a cabo en Quito, Ecuador.
- López, M. 2015. Sistemas alternativos de producción: el caso de la producción orgánica. *Nutrición Animal Tropical*. San José, Costa Rica. 9(1): 48-59 pp.
- López, M. WingChing, R. Rojas, A. 2015. Valoración nutricional de ensilajes de corona de piña con adición de heno y urea. *Nutrición Animal Tropical*. 9(2): 65-90 pp.

- López, M., Briceño, E. 2016. Efecto de la frecuencia de corte y la precipitación en el rendimiento de *Cratylia Argentea* orgánica. *Nutrición Animal Tropical*. San José. Costa Rica. 10(1): 24-44 pp.
- López, M. WingChing, R. Rojas, A. 2016. Bromatología de ensilados de corona de piña con pulpa de cítricos, heno y urea. *Agronomía Mesoamericana*. 27(1): 37- 47 pp.
- López-Herrera, M., Rojas-Bourrillon, A., Zumbado-Ramírez, C. 2017. Nutritional and fermentative characteristics of Cameroon grass silage with Pelipita banana. *Mesoamerican Agronomy*, 28(3): 629-642.
- Lovett, D., McGilloway, D., Bortolozzo, A., Hawkins, M., Callan, J., Flynn, B., O'Mara, F. 2005. In vitro fermentation patterns and methane production as influenced by cultivar and season of harvest of *Lolium perenne* L. *Grass. Forage Science*. (61): 9-21 pp.
- Loyola, N., Nuñez, P., Acuña, C. 2013. Extracción y análisis de pectinas a partir de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. O'Neall. *Revista FCA UNCUYO*. 45(1): 79-89 pp.
- Makkar, H., Blümmel, M., Becker, K. 1996. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of Science Food Agriculture*. 69: 481-493 pp.
- Mansfield, H., Stern, M., Otterby, D. 1994. Effects of beet pulp and animal by-products on milk yield and in vitro fermentation by rumen microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 77(1): 205-216 pp.
- Meale, S., Chaves, A., Baah, J., McAllister, T. 2012. Methane production of different forages in In Vitro ruminal fermentation. *Asian- Australian Journal of Animal Science*. 25(1): 86-91 pp.

- Mehrez, A., Orskov, E., McDonald, Y. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal Nutrition*. 38: 437-443 pp.
- Mier, M. 2009. Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. Universidad de Córdoba. Trabajo Final de Master. Córdoba, Colombia. 28 p.
- Monsalve, L., Ávila, P., Lascano, C. 2006. Fermentación ruminal, flujo de proteína al duodeno y absorción de N en ovinos alimentados con mezclas de leguminosas. Segundo taller de taninos en la nutrición de rumiantes. Colombia. 46 p.
- Montenegro, J., Barrantes, E. 2016. Implementación de la técnica de hexafluoruro de azufre para cuantificar metano entérico en bovinos en Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*. 50(2): 62-74 pp.
- Montero, E. 2016. Evaluación de las propiedades fermentativas, nutricionales y el costo de elaboración de ensilajes de Poró (*Erythrina poeppigiana*) y *Cratylia* (*Cratylia argentea*) con niveles crecientes de inclusión de guineo cuadrado (*Musa sp*), para alimentación de rumiantes. Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica 22-39 pp.
- Muñoz, L. 2005. Estudio económico preliminar de una planta para la producción de jarabe con alto contenido de maltosa a partir de sagú. Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica. 4 p.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Research Council. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition. Seven Revised Edition.
- Oba, M. Allen, M. 2000. Effect of Brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent

- fiber: 3. Digestibility and microbial efficiency. *Journal of Dairy Science*. 83: 1350-1358 pp.
- Palladino, A. Wawrzkievicz, M. Bargo, F. 2006. La Fibra. Departamento de Producción Animal. Facultad de Agronomía. UBA. Buenos Aires. Argentina. 1-3 pp.
- Pezo, D. Ibrahim, M. 1999. Sistemas Silvopastoriles. Módulo de Enseñanza Agroforestal N° 2. CATIE. Turrialba. Costa Rica. 99-116 pp.
- Relling, A., Mattioli, G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. 28 pp.
- Rojas, A. 1995. Conceptos básicos en Nutrición de Rumiantes. Escuela de Zootecnia. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 16 p.
- Sánchez, J. 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. 1-4 pp.
- Satter, L. Slyter, L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition*. 32: 199-208 pp.
- Tobía, C. Rojas, A. Villalobos, E. Soto, H. Uribe, L. 2004. Sustitución parcial del 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 pp.
- UPEB (Unión de Países Exportadores de Banano). 1978. Procesamiento de los excedentes de la producción bananera (banano y plátano) y sus subproductos para ser empleados en la alimentación animal. En: Programa

coordinado de investigaciones. Propuestas de investigación, Subprograma: Utilización del banano y el plátano. Panamá. 450 pp.

Urquijo, L., Arévalo, J., Díaz, J. Arévalo, S., Trigos, C. 2012. Tasa de Pasaje en Bovinos. Universidad Francisco de Paula Santander, Ocaña. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Nutrición Animal. Zootecnia. 2 p.

Van Soest, P. 1978. Dietary Fibers: Their definition and nutritional properties. Am. J. Clin. Nutr. Estados Unidos. 31-40 pp.

Van Soest, P. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2ª Edición. Cornell University Press. Estados Unidos. 253-316 pp.

Vargas, J., Cárdenas, E., Pabón, M., Carulla, J. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Archivos de zootecnia. (61): 51-66 pp.

Willén, A. 2011. Methane Production from Dairy Cows Relations between Enteric Production and Production from Faeces and Urine. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Animal Nutrition and Management. 7-34 pp.

Zavaleta, E. 1975. Los Ácidos Grasos Volátiles, Fuente de Energía en los Rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. 227 p.

ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de correlaciones entre la calidad nutricional de la mezcla ensilada y calidad de la fibra y los parámetros de fermentación ruminal.

Variable 1	Variable 2	C. Pearson	Valor de p
CH ₄ (L/kg MS)	Almidón	-0,46	0,0088
	Pectinas	-0,53	0,0018
	A. Acético	0,68	<0,0001
	A. Propiónico	-0,61	0,0002
CH ₄ (L/kg MSD)	Almidón	-0,53	0,0018
	Pectinas	-0,54	0,0015
	A. Acético	0,65	0,0001
	A. Propiónico	-0,58	0,0005
Almidón	iFDN (%FDN)	-0,66	<0,0001
	dFDN (%FDN)	0,66	<0,0001
	FDN	-0,69	<0,0001
	FDA	-0,64	0,0001
	Lig	-0,66	<0,0001
	TND	0,64	0,0001
	CNF	0,66	<0,0001
Pectinas	A. Acético	-0,51	0,0026
	A. Propiónico	0,53	0,0017
	A. Butírico	-0,43	0,0151
	FDN	-0,41	0,0193
NH ₄ (mg/100 ml)	PC	0,51	0,0029
	TND	-0,45	0,0100
A. Acético	A. Propiónico	-0,97	<0,0001

	A. Butírico	0,62	0,0002
A. Propiónico	A. Butírico	-0,79	<0,0001
iFDN (%FDN)	CNF	-0,98	<0,0001
	TND	-0,98	<0,0001