



Producción de metano *in vitro* y parámetros fermentativos de mezclas de ensilado de girasol silvestre y pasto elefante, inoculadas o no con cepas de bacterias ácido-lácticas epífitas



Vilma Amparo-Holguín ^{a,b}

Mario Cuchillo-Hilario ^{c,d*}

Johanna Mazabel ^e

Steven Quintero ^e

Siriwan Martens ^e

Jairo Mora-Delgado ^b

^a National University of Colombia (UNAL). Palmira, Colombia.

^b University of Tolima. Livestock Agroforestry System Research Group. Ibagué, Colombia.

^c Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. INCMNSZ. Departamento de Nutrición Animal Fernando Pérez-Gil Romo. Ciudad de México, México.

^d Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. Estado de México, México.

^e The Alliance of Bioversity International and CIAT. Cali, Colombia.

*Autor de correspondencia: mario.cuchilloh@incmnsz.mx

Resumen:

La presente investigación se llevó a cabo para determinar el grado de incorporación de *Tithonia diversifolia* (TD) y la posibilidad de mezclarla con *Pennisetum purpureum* (PP) para obtener el máximo beneficio para la ensilabilidad y para la nutrición animal. Las mezclas de ensilado de girasol silvestre (TD) y pasto elefante (PP) se evaluaron en función de la

composición química, la cuantificación de la producción de gas, la liberación de metano y los parámetros de fermentación. Las mezclas de ensilado se organizaron en cuatro proporciones de *T. diversifolia* / *P. purpureum*, a saber: 100/0; 67/33; 33/67; y 0/100 (peso fresco). Los ensilados con mayores proporciones de *T. diversifolia* aumentaron el contenido de proteína cruda, la digestibilidad *in vitro* al tiempo que disminuyeron las fracciones de FDN y FDA ($P<0.05$). Las altas cantidades de *T. diversifolia* mostraron los valores de producción de gas más bajos (160.2 ml), mientras que los tratamientos con mayor incorporación de pasto produjeron una mayor cantidad de gas, hasta 194.5 ml. La producción de metano fue mayor al aumentar la proporción de *P. purpureum* en las mezclas de ensilado. El inóculo del ensilado no tuvo ningún impacto en la producción de gas *in vitro* ($P<0.05$). Además, las proporciones más altas de *T. diversifolia* redujeron el proceso de acidificación, mientras que la inclusión de *P. purpureum* facilitó valores de pH más bajos. El inóculo de bacterias ácido-lácticas tendió a disminuir el pH de los ensilados, pero no se observaron efectos claros sobre la temperatura del ensilado. Los ensilados con proporciones altas de *T. diversifolia* (67 % de incorporación) serían más apetecibles para los animales y también podrían traducirse en un mayor rendimiento animal debido a un mayor suministro de proteínas y una mejor digestibilidad que los ensilados con mayor proporción de *P. purpureum* (67 y 100 % de incorporación).

Palabras clave: Producción de gas, Inóculo, Fermentación Ruminal, Girasol mexicano, Forraje tropical.

Recibido: 11/12/2019

Aceptado: 02/11/2020

Introducción

La creciente competencia actual entre la producción de alimentos humanos y los recursos de alimentos para animales exige nuevas alternativas de alimentos para animales que no comprometan el suministro de alimentos para humanos. Existe un interés especial en la investigación sobre especies forrajeras no convencionales que se pueden ofrecer como heno o ensilado durante todo el año, particularmente en momentos de escasez de alimento como en caso de sequía o inundaciones^(1,2,3). *Tithonia diversifolia* (TD) es una especie no leguminosa que se distribuye ampliamente en zonas húmedas y subhúmedas de América, África, Asia y en regiones cercanas a los cinturones tropicales y subtropicales^(4,5). Se ha descrito como un arbusto polivalente con un considerable potencial para la producción animal debido a su valiosa fuente de proteínas y alta palatabilidad^(6,7). Asimismo, los forrajes tropicales de baja calidad constituyen algunos de los principales factores que limitan el

desarrollo de los sistemas de producción ganadera debido al bajo rendimiento animal. Esta es la razón por la cual el forraje excesivo de alta calidad producido durante la temporada de lluvias debe conservarse como ensilado^(2,8). Teniendo en cuenta que la TD muestra una alta distribución natural en países tropicales, esta planta subutilizada puede contribuir a la producción ganadera si su follaje se conserva como ensilado^(5,9,10).

Entre los forrajes tropicales, algunas legumbres y herbáceas no leguminosas como la TD muestran mejores valores nutricionales que las gramíneas, por lo que incluir TD en las dietas animales favorece el contenido de proteína cruda, reduce los valores de fibra y mejora la digestibilidad de los alimentos⁽⁷⁾. A pesar de que el alto contenido de proteínas de TD oscila entre el 10.3 y el 25.6 %^(4,5), solo se han realizado unos pocos estudios de producción de ensilado para investigar el potencial de ensilabilidad de TD. Por lo tanto, es necesario determinar el grado de incorporación de TD y la posibilidad de mezclarlo con pasto para obtener el máximo beneficio para la nutrición animal y para los hogares de los agricultores.

El procedimiento apropiado de ensilado significa que la fermentación del ácido láctico se produce en ausencia de oxígeno. Una acidificación rápida normalmente ocurre cuando una cantidad suficiente de ácido láctico es producida por bacterias ácido-lácticas (BAL) presentes en las superficies de la planta^(9,11). En este sentido, es importante mejorar la acidificación láctica para lograr un proceso de fermentación exitoso. Este efecto puede facilitarse inoculando BAL^(12,13). Las bacterias ácido-lácticas homofermentativas seleccionadas se han desarrollado tradicionalmente en países templados para favorecer la acidificación láctica y disminuir el pH de los ensilados^(8,9,11). Sin embargo, la mayoría de las cepas disponibles comercialmente a la fecha tienen un rendimiento deficiente cuando se inoculan en ensilados tropicales⁽¹²⁾. Por lo tanto, las bacterias epífitas seleccionadas parecen ser una buena alternativa para mejorar los parámetros fermentativos de los forrajes tropicales durante el proceso de ensilado. Los trabajos de investigación han estudiado cepas BAL epífitas aisladas de especies de forraje tropical como candidatas prometedoras que podrían usarse como aditivos de ensilado para superar las limitaciones de los inoculantes comerciales y minimizar las pérdidas de valor nutricional del ensilado^(11,12,14). Sin embargo, los estudios de emisiones de metano que tratan de los ensilados y aditivos de BAL también son escasos⁽¹⁵⁾.

Por otro lado, uno de los métodos comúnmente aceptados para determinar la calidad de la alimentación animal es la técnica de producción de gas. La metodología de producción de gas *in vitro* determina el grado y la cinética de la degradación del alimento en función del volumen de gas liberado, tanto directamente como producto de fermentación, como indirectamente de la neutralización del fluido ruminal^(16,17,18). En este sentido, se ha establecido que la producción entérica acumulada de CH₄ en rumiantes aumenta con el tiempo de fermentación, pero también disminuye la eficiencia de utilización de la energía y contribuye al efecto global de los gases de efecto invernadero^(19,20). El metano es producido en condiciones anaeróbicas por microorganismos ruminales llamados arqueas

metanogénicas, que ganan energía al reducir el CO₂ con H₂ para formar CH₄^(19,21). La producción de metano depende principalmente de la cantidad y calidad de los forrajes consumidos por los animales^(22,23,24). Así, la mitigación de la producción de metano de los rumiantes podría lograrse modificando su dieta^(21,25). Estudios previos han sugerido que el aumento de la calidad del forraje disminuye la proporción de CH₄ en el gas emitido, lo que significa una reducción de las emisiones por unidad de aumento de peso o por unidad de producto animal producido como leche o carne debido a la mejora de la productividad animal^(22,26,27). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro niveles diferentes de incorporación de *T. diversifolia* (100, 67, 33 y cero %) en mezcla con *P. purpureum*, así como el enriquecimiento o no con una cepa de BAL epífita o comercial. Se evaluó la calidad nutricional (MS, PC, FDN, FDA, DMSIV y cenizas), la liberación de metano y la ensilabilidad de los parámetros de los ensilados.

Material y métodos

Material vegetal

Se cosecharon muestras de forraje TD (biomasa de 40 cm sobre el suelo, incluidas hojas y tallos) en la etapa de prefloración en febrero de 2014 y a los 60 d de edad. La materia seca de TD en la cosecha fue del 17.6 %. Los cultivares se ubicaron en la finca experimental de la Universidad Nacional de Colombia en Palmira, a 1,000 msnm, 24 °C, precipitación anual de 1,020 mm, y humedad relativa de 72 %. Complementariamente, *P. purpureum* (PP) se cosechó en etapa vegetativa, 10 cm sobre el nivel del suelo y 75 d de edad, al mismo tiempo y lugar. La materia seca de PP a esa edad promedió 18.7 %. La biomasa vegetal de TD y PP se recolectó a mano y se trasladó al laboratorio para elaborar cuarenta y ocho mezclas de microsilos de un kilogramo cada una. Después de eso, las muestras de vegetación se cortaron mecánicamente en secciones de un tamaño de partícula que oscilaba entre dos y tres cm utilizando un picador de hierba eléctrico (7.5 hp, 1400 rpm; Gaitan).

Preparación del ensilado

El material forrajero de TD y PP se marchitó al 30 % y al 35 % de materia seca antes del ensilado. Las diferentes mezclas de ensilado se hicieron de la siguiente manera: TD y PP se organizaron en cuatro proporciones diferentes. Proporción 1: 100/0; Proporción 2: 67/33; Proporción 3: 33/67; y Proporción 4: 0/100, base MF. Posteriormente, cada proporción fue inoculada o no: 1) muestra de testigo (sin inóculo); 2) cepa T735 de bacterias ácido-lácticas (BAL) epífitas; y 3) SIL-ALL^{®4x4}, resultando en 12 tratamientos en total. La T-735 es una cepa de BAL epífita (*Lactobacillus paracasei*) aislada de la superficie del tejido de TD y ha sido probada en estudios previos como inoculante de ensilado^(9,10). SIL-ALL^{®4x4} es una mezcla comercial de inóculo de *Streptococcus faecium*; *L. plantarum*; *Pediococcus*

acidilactici y *L. salivarius*. El inóculo bacteriano se diluyó para aplicar 1 ml por kg de forraje fresco. Cada inoculante se cultivó previamente de la siguiente manera: 0.1 ml de un inóculo 4×10^9 UFC ml^{-1} cultivado en caldo MRS de 10 ml a 37 °C durante 24 h. Las mezclas de forraje de 1,000 g cada una se envasaron en bolsas de plástico envasadas al vacío (18.5 cm \times 29 cm; bolsas selladoras al vacío de microcanales Quart, modelo No. 30-0101-W, 0.9 L, China), según las pautas de Rostock Model Silages^(28,29), las mezclas de forraje TD y PP se comprimieron a mano. Más tarde, se evacuó el aire de los microsilos y fueron termosellados para asegurar la hermeticidad. Se utilizó un sellador al vacío (acero inoxidable Westonbrand PRO 2300, Vista, CA, EE. UU.) para proporcionar las condiciones anaeróbicas para facilitar la fermentación láctica y la acidificación del ensilado. Los microsilos se envolvieron con cinta adhesiva para evitar deformaciones de los microsilos debido a la hinchazón. Posteriormente, se perforaron las bolsas de polietileno con aguja de inyección desinfectada. Cada bolsa envuelta se colocó inmediatamente en una segunda bolsa (26 cm \times 39 cm; bolsas selladoras al vacío de microcanal, modelo No. 30-0102-W, China) a la que se le evacuó el aire en las mismas condiciones. Dos réplicas adicionales de las muestras (~ 250 g) se llenaron en bolsas más pequeñas para abrirlas después de tres días de ensilado a una temperatura de almacenamiento de 25 ° C para la determinación de MS. Más tarde, los microsilos se almacenaron en la oscuridad durante 90 días a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C. A los 90 días se abrieron las bolsas y se midió el pH y la temperatura. El pH se midió utilizando un medidor de pH (Mettler Toledo, o SevenGo, con electrodo de pH InLab@ 41356/2mat), desinfectando el electrodo con etanol al 70 % antes de cada registro. La temperatura se midió utilizando un termómetro digital de mínimo y máximo para interior y exterior. Se introdujo un sensor en el material del ensilado, mientras que un segundo se utilizó para registrar la temperatura ambiente simultáneamente. Además, las muestras se liofilizaron y se molieron en un rotor de molino de laboratorio Thomas Wiley modelo 4 provisto de una malla de 1.0 mm para realizar el gas de prueba. Así, se analizaron 12 tratamientos en total, con cuatro réplicas, resultando en 48 microsilos como un agujero.

Valor nutricional

Se analizó un conjunto de muestras de ensilado en el Laboratorio de Calidad de Forrajes del CIAT. El contenido de materia seca (MS) se determinó utilizando un horno de aire forzado a 65 °C hasta un peso constante durante 72 h. También se realizaron las siguientes determinaciones: i) proteína cruda (PC) por el método Micro-Kjeldahl; ii) fibra insoluble en detergente neutro y ácido (FDN y FDA) siguiendo la secuencia descrita por Van Soest *et al.*⁽³⁰⁾; iii) y extracto etéreo (EE) por extracción soxhlet descrita por Palmquist y Jenkins⁽³¹⁾. La metodología de Tilley y Terry⁽¹⁸⁾ modificada por Moore⁽³²⁾ se utilizó para determinar la digestibilidad. El contenido de cenizas se determinó mediante incineración directa del material seco en un horno de mufla a 500 °C según el método oficial de la AOAC⁽³³⁾. El

análisis se realizó en los 12 tratamientos (con las cuatro repeticiones correspondientes) por triplicado.

Producción de gas *in vitro*

El forraje fresco se sometió a un proceso de secado en un horno convencional a una temperatura de 65 °C durante 72 h. Luego se procesó en un molino de laboratorio Thomas Wiley modelo 4 con un tamiz de malla de 1.0 mm. El fluido ruminal se obtuvo de dos toros Brahman jóvenes canulados pastando *Cynodon plestotachyus* (pasto estrella) y sal mineralizada suplementada *ad libitum*. Los toros canulados no tuvieron acceso a alimentos durante una hora antes de comenzar la recolección de líquido ruminal. La recolección de muestras ruminales se realizó a mano. Luego, se exprimió a través de un trozo de gasa para extraer los contenidos sólidos del rumen, se almacenó en termo de 2.0 L, y se conservó en agua caliente a 39 °C durante aproximadamente 10 min, para ser enviado al laboratorio. Luego, el líquido ruminal se licuó durante 20 seg y se volvió a filtrar antes de ser transferido a los matraces de Erlenmeyer. El licor ruminal se saturó entonces con CO₂.

Siguiendo a Theodorou *et al*⁽¹⁷⁾, se preparó un medio de digestión con algunas modificaciones. La incubación se realizó en matraces con una capacidad de 160 ml cada uno. Para ello, se pesó un gramo de muestra seca y molida, y se añadieron 85 ml del medio de digestión gaseado con CO₂. Posteriormente, se añadieron cuatro ml de agente reductor (preparado en el momento de su uso, mezclando cisteína-HCl (625 mg), 1M NaOH (4 ml) y Na₂S • 9H₂O (625 mg) en 100 ml de agua destilada); las tapas de goma se colocaron y se aseguraron con sellos metálicos. Por último, las botellas se enfriaron en el refrigerador a 4 °C durante 24 h. Una vez transcurrido este período, las botellas se retiraron del refrigerador y se colocaron en un baño de agua a 39 °C. Cuando el sistema de incubación estaba en equilibrio de temperatura, la inoculación en cada botella se realizó utilizando 10 ml de licor ruminal. Junto con las muestras, se inocularon seis botellas que contenían solo el “medio de digestión”. Estos se consideraron “blancos”, los cuales fueron utilizados para corregir la producción de gas causada por la fermentación del inóculo y el medio. Para ello, se utilizó un transductor de presión (Sper Scientific®, EE. UU.) conectado a un lector digital y una válvula de tres vías. La primera vía se conectó a una aguja 22G (25 mm x 0.7 mm); la segunda al transductor y la tercera a una jeringa de 60 ml. Esto último hizo posible medir el volumen.

Antes de comenzar el proceso de incubación y fermentación, todas las botellas se restablecieron a cero psi, eliminando cualquier volumen producido en la sección superior de cada botella. Las mediciones de volumen y presión se realizaron a las 3, 6, 9, 12, 24, 33, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 h. Después de cada lectura, las botellas se agitaron e incubaron de nuevo en un baño de agua a 39 °C. Al finalizar el periodo de incubación, el contenido de cada matraz se filtró (papel de filtro; tamaño de poro de 5 µm) utilizando una bomba de vacío

y se secó en un horno a 104 °C durante la noche. La materia seca degradada se calculó como la diferencia entre el peso de la muestra al comienzo de la incubación y el peso del residuo en el crisol al final de la incubación. Las muestras se realizaron en cuadruplicado.

Liberación de metano

La concentración de CH₄ en el gas producido se determinó en el Laboratorio de Gases de Efecto Invernadero del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 (Shimadzu[®], Japón) con un detector de ionización de llama (DIL) a una temperatura de 250 °C y un detector de captura de electrones a 325 °C bajo las siguientes condiciones: horno a 80 °C y columnas Shimadzu 4mH-D 80/100.07m S-Q y 1.5 P-N. El inyector directo funcionaba a temperatura ambiente. El gas portador fue nitrógeno y la tasa de flujo de la columna fue de 30.83 ml/min. El volumen de inyección fue manejado por un bucle con una capacidad de 2 ml. Las muestras se realizaron en cuadruplicado.

Modelo de regresión

Se probaron diferentes modelos no lineales y el modelo de Gompertz fue el que presentó la mejor bondad de ajuste determinada por las estadísticas del criterio de información bayesiana (BIC) y el criterio de información de Akaike (AIC). Así, se utilizó una ecuación de Gompertz^(34,35,36) para modelar la acumulación de gas de las diferentes mezclas utilizadas en los ensilados, donde los parámetros α , β y γ se estimaron mediante análisis de regresión no lineal utilizando el software Infostat. Se empleó la siguiente ecuación (Eq. 1): $Y = \alpha * \exp(-\beta * \exp(-\beta * \gamma))$; Donde: Y es igual a la producción acumulada de gas en el momento x, $\alpha > 0$ es la producción máxima de gas; el parámetro $\beta > 0$ es la diferencia entre el gas inicial y el gas en el momento x, y el parámetro $\gamma > 0$ describe la tasa específica de acumulación de gas. La aplicación práctica de este modelo requiere traducir los parámetros α , β , γ a su relevancia biológica. Para los fines de este estudio, los parámetros son: tiempo hasta el punto de inflexión (HPI, horas), punto de inflexión del gas (PIG ml), tasa máxima de producción de gas (TMPG, ml/h) y fase de latencia (FL o acomodación microbiana h). Para estimar los parámetros biológicos, se utilizaron las siguientes fórmulas, Eq. 2: $HPI = \alpha / \gamma$; Eq. 3: $PIG = \alpha / e$; Eq. 4: $TMPG = (\alpha * \gamma) / e$; y Eq. 5: $FL = ((\beta / \gamma) - (1 / \gamma))$; donde e es el número de Euler, que es aproximadamente 2.718281828459.

Análisis estadístico

Los valores de producción de gas fueron analizados con el programa InfoStat, utilizando la subrutina “Estimación de Modelos Lineales Generales y Mixtos”, asumiendo varianzas heterogéneas⁽³⁷⁾. Para el modelo general aplicado a los factores estudiados, la proporción de

T. diversifolia / *P. purpureum* - (TD/PP) en la dieta y el inóculo fueron las variables predictoras (factores). Se utilizó un diseño experimental de dos factores, donde el primer factor fue el nivel de incorporación de TD en los ensilados, y el segundo el tipo de inoculante utilizado: $Y_{ij} = \mu + PTD_i + I_j + PTD_{ij} \times I + \varepsilon$; donde Y= es la variable objetivo; μ es la media general; PTD= proporción de TD en el ensilado (100, 67, 33 y cero %); I= inoculante (control; T735; SIL-ALL^{®4x4}) y ε = el error experimental aleatorio. En el presente experimento, se evaluaron doce tratamientos en total. Para realizar el análisis estadístico, el valor n empleado fue de 156, mientras que se utilizaron doce iteraciones. A su vez, se realizaron diferentes análisis de la varianza correspondiente a cada hora de muestreo para mostrar las diferencias estadísticas entre tratamientos, y se detectaron diferencias estadísticas mediante comparaciones de medias de Duncan ($\alpha < 0.05$).

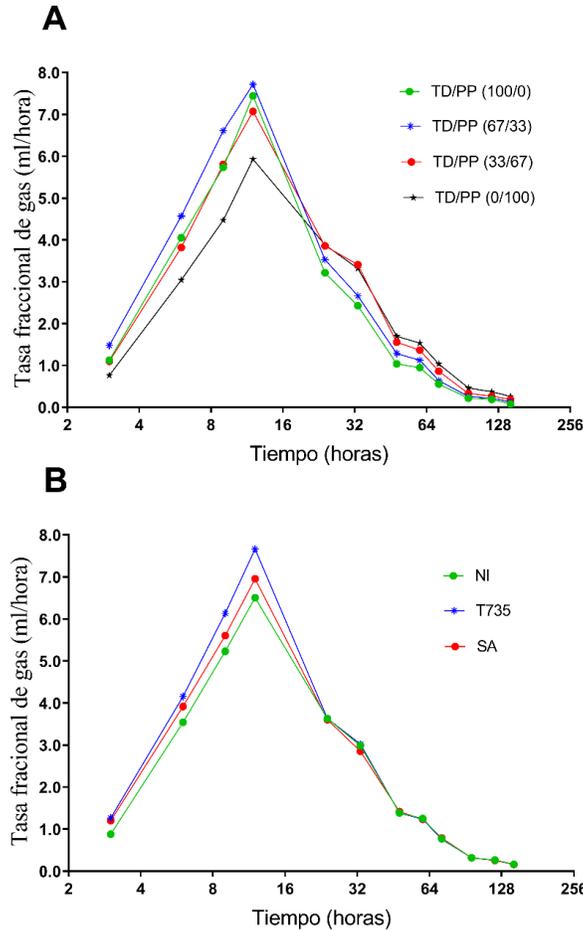
Resultados

Los resultados mostraron que a medida que aumentaba el nivel de inclusión de PP en las mezclas de ensilado, se obtenían niveles más bajos de proteína ($P < 0.05$) (Cuadro 1). Este efecto fue opuesto para TD; es decir, una mayor inclusión de TD produjo mayores contenidos de PC en las mezclas de ensilado. En el 100 y 67 % de inclusión de *T. diversifolia*, la PC fue superior en los ensilados sin inóculo (18.1 y 15.1 %) que en ambos ensilados inoculados. Sin embargo, no se observaron efectos del inóculo sobre los ensilados con mayor inclusión de PP. Los valores de PC en promedio para 100, 67, 33 y cero % de inclusión de TD fueron 16.9, 13.4, 8.7 y 5.2 %, respectivamente. Mostrando una tendencia negativa a medida que la inclusión de TD disminuía. En contraste, las fibras (FDN y FDA) tienen una respuesta opuesta. Cuando TD se ensiló solo; los valores fueron más bajos: 36.1 y 25.2 % para FDN y FDA, respectivamente. Sin embargo, cuando la TD se ensiló en 67 % (41.9 y 29.0), en 33 % (44.7 y 33.9) y en cero % (58.0 y 38.5) de inclusión, los valores tanto de FDN como de FDA aumentaron. Además, los datos muestran que la inclusión de TD mejora significativamente el DMSIV en comparación con el ensilado con PP al 100 %; por ejemplo, la TD ensilada sola (67.2 %) fue más digerible que la PP ensilada sola (63.6 %).

Las tasas más altas de gas fraccionado (ml/h) de las mezclas ensiladas ocurrieron entre 9 h y 12 h. La mayor parte del gas fue producido por la mezcla ensilada 67:33 TD/PP a las 12 h (Figura 1A). Aunque no hubo diferencias significativas con respecto a los ensilados preparados exclusivamente de TD (100:00 TD/PP) y de los ensilados preparados con alta proporción de pasto (33:67 TD/PP), sí hubo diferencias ($P < 0.05$) con respecto a los ensilados preparados exclusivamente de PP (00:100 TD/PP). La producción de gas después de 12 h disminuyó significativamente del pico anterior con una producción de gas entre 3.2 ml/h y 3.9 ml/h, lo que significa una caída del 50 %. El mayor efecto de la interacción entre tratamientos e inóculos sobre la producción de gas (ml) por hora se observó durante las

primeras horas de fermentación (Figura 1B). No se observaron grandes diferencias después de 32 h de observación para la producción de gas fraccionado.

Figura 1: Tasa fraccional de gas de mezclas de ensilado de *Tithonia diversifolia* / *Pennisetum purpureum*, enriquecida o no enriquecida con cepas de bacterias ácido-lácticas

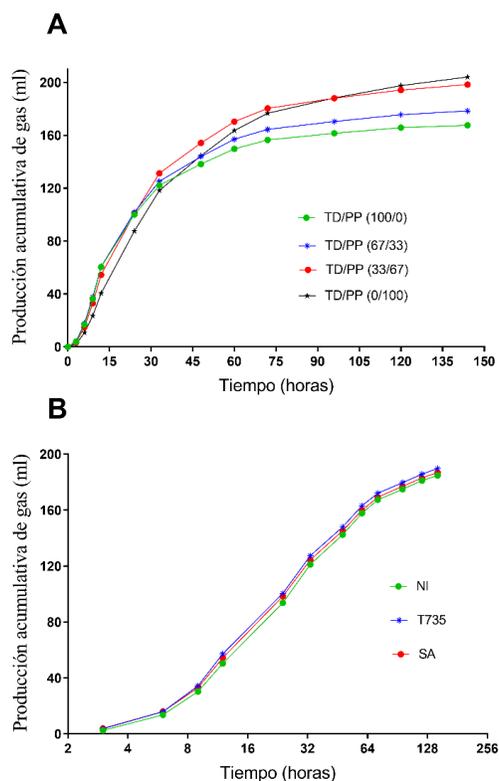


A= efecto del tratamiento. B= efecto del inóculo. TD/PP= proporciones de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* [Base de materia fresca (MF)]. NI= sin inóculo; SA= Sil-all es una mezcla comercial de inóculos de bacterias ácido-lácticas. T-735= es una cepa de bacterias ácido-lácticas epifitas.

Los resultados mostraron una menor producción acumulada de gas a las 144 h en ensilados preparados exclusivamente de TD (160 ml) en comparación con los otros tratamientos (Figura 2A). Se encontró un aumento en la producción de gas en los ensilados preparados exclusivamente de pasto (194 ml). Los resultados de la interacción entre la mezcla (TD/PP) y el inóculo indican que, independientemente de la inoculación de BAL, los ensilados preparados con una mayor inclusión de TD produjeron una menor cantidad de gas, lo que significa que una mayor tasa de inclusión de PP en el proceso de ensilado aumenta la producción de gas. Los resultados de la ecuación de Gompertz indican que las tasas de producción de gas más altas fueron las siguientes: ensilados preparados exclusivamente de pasto+Silall; los ensilados preparados exclusivamente de pasto+T735; y los ensilados

preparados exclusivamente de pasto sin inóculo, respectivamente (Cuadro 2). Por el contrario, se reportaron valores más bajos para los tratamientos con mayores proporciones de TD [TD/PP: 100/0 y 67/33 % de inclusión, respectivamente]. Un análisis del gas acumulativo reveló que el parámetro α , que representa la tasa máxima de producción de gas, fue mayor en los ensilados preparados con alta proporción de pasto y los ensilados preparados exclusivamente de pasto (194.5 y 189.7 ml) donde la proporción de pasto fue la más alta. Las mezclas ensiladas mostraron aumentos en la producción acumulada de gas por gramo de materia seca a lo largo del tiempo. Lo mismo ocurrió con el parámetro PIG, donde los ensilados preparados con alta proporción de pasto y los ensilados preparados exclusivamente de pasto (67 y 100 de inclusión de PP) mostraron valores más altos que los ensilados preparados exclusivamente de TD (TD/PP: 100/0) y bajas proporciones de pasto (TD/PP: 67/33) ($P < 0.05$). Los ensilados preparados exclusivamente de pasto tuvieron el mayor tiempo hasta el punto de inflexión (HPI) cercano a las 64 h y la misma tendencia para el tiempo de colonización microbiana (FL; 44.8) con un retraso estadísticamente significativo frente al resto de los tratamientos.

Figura 2: Producción acumulativa de gas de mezclas de ensilado de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum*, enriquecido o no enriquecido con cepas de bacterias ácido-lácticas



A= efecto del tratamiento. B= efecto del inóculo. MSD: Materia seca degradada. TD/PP= proporciones de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* [Base de materia fresca (MF)]. NI= sin inóculo; SA= Sil-all es una mezcla comercial de inóculos de bacterias ácido-lácticas. T-735= es una cepa de bacterias ácido-lácticas epífitas.

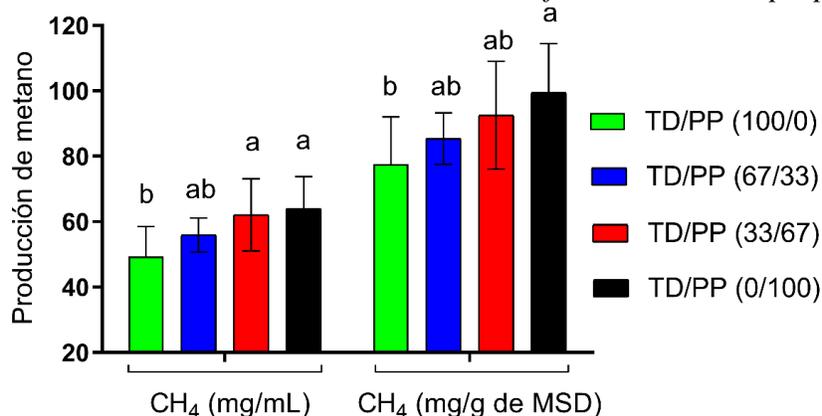
Cuadro 2: Parámetros del modelo de Gompertz para la producción de gas observados en mezclas de ensilados con diferentes niveles de inclusión de *Tithonia diversifolia* (TD) y *Pennisetum purpureum* (PP), enriquecidas o no enriquecidas con cepas de bacterias ácido-lácticas

Inclusión	α	β	γ	HPI (h)	PIG (mL)	TMPG (mL/h)	FL (h)
TD/PP:							
100/0	160.2±1.62c	3.09±0.17c	0.08±0.0a	39.08c	58.93c	4.67a	26.43c
TD/PP:							
67/33	170.11±1.75b	3.03±0.15c	0.07±0.0b	42.35c	62.58b	4.48a	28.36c
TD/PP:							
33/67	189.65±1.19a	3.20±0.09b	0.06±0.0c	51.36b	69.77a	4.36a	35.29b
TD/PP:							
0/100	194.45±1.33a	3.34±0.10a	0.05±0.0d	63.96a	71.53a	3.76b	44.79a

TD/PP = proporciones de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* [Base de materia fresca (MF)]. α = es el volumen máximo de producción de gas; β = es la diferencia entre el gas inicial y el gas en el momento x; γ = describe la tasa de acumulación de gas específica. HPI= tiempo hasta el punto de inflexión; PIG= punto de inflexión del gas; TMPG= tasa máxima de producción de gas. FL= fase de latencia (FL o acomodación microbiana).

Se realizaron análisis de la producción neta de CH₄ a partir del gas generado a las 72 h de incubación de 1 g de ensilado (Figura 3). La degradación de la MS osciló entre el 63.7 % y el 64.4 %. Cabe señalar que a las 60 h después del inicio de la incubación y cerca del punto de inflexión (HPI), se obtuvo aproximadamente del 80 al 88 % del gas total producido durante el experimento. Se produjo una menor cantidad de metano en los ensilados preparados exclusivamente de TD (TD/PP: 100/0) en relación con los ensilados preparados con alta proporción de pasto y los ensilados preparados exclusivamente de pasto (67 y 100 de inclusión de PP), pero no fue significativamente diferente de los ensilados preparados con bajas proporciones de pasto (TD/PP: 67/33). Se observó una mayor liberación de metano a medida que aumentaba la proporción de PP en la mezcla, mientras que la producción de metano más baja se encontró en los ensilados que contenían la mayor proporción de TD (100/0 de TD/PP).

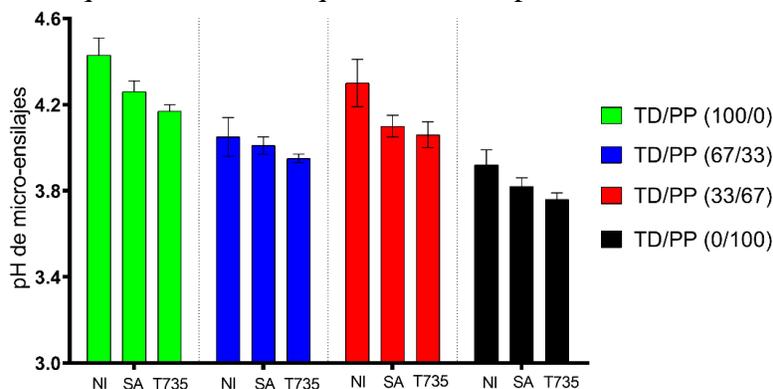
Figura 3: Producción de metano por gramo de ensilado de materia seca (a 70 h) incubado a diferentes niveles de inclusión de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum*



TD/PP= proporciones de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum*. [Base de materia fresca (MF)]. MSD: Materia seca degradada. Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

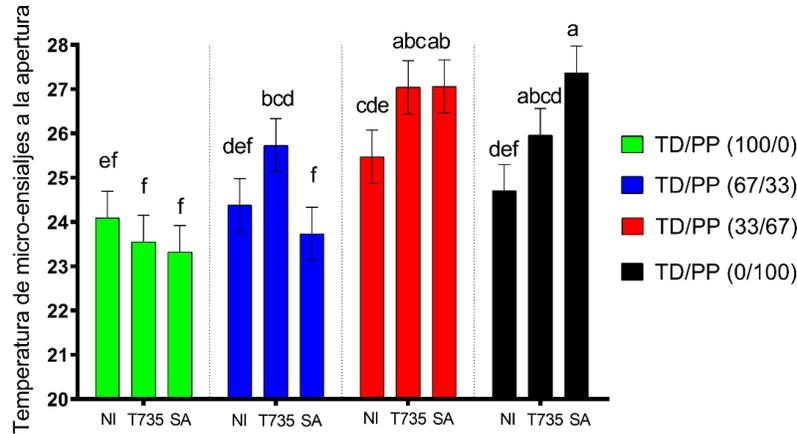
Además, los hallazgos del experimento indican que el pH tendió a disminuir a medida que aumentaba la proporción de PP en las mezclas, pero no se observaron diferencias estadísticas (Figura 4). De alguna manera, la adición de BAL disminuyó la acidificación de los ensilados. Aunque el grado de acidificación fue máximo con la adición de la cepa T735 seguida de Silall y el tratamiento de control, no se obtuvieron diferencias estadísticas. Se observó una tendencia opuesta en el parámetro de temperatura, que aumentó a medida que se incrementaba la proporción de PP en las mezclas, a excepción de los ensilados preparados exclusivamente de TD (TD/PP: 100/0). Además, no se observó un efecto claro del inóculo sobre la temperatura del ensilado, sin embargo, T735 y Silall fueron más efectivos a medida que la proporción de PP aumentaba en las mezclas de ensilado (Figura 5; $P < 0.05$).

Figura 4: pH en la apertura de los ensilados de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* enriquecidos o no enriquecidos con cepas de bacterias ácido-lácticas



TD/PP= proporciones de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* [Base de materia fresca (MF)]. NI= sin inóculo; SA= Sil-all es una mezcla comercial de inóculos de bacterias ácido-lácticas. T-735= es una cepa de bacterias ácido-lácticas epífitas.

Figura 5: Temperatura en la apertura de los ensilados de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* enriquecidos o no enriquecidos con cepas de bacterias ácido-lácticas



NI= sin inóculo; SA= Sil-all es una mezcla comercial de inóculos de bacterias ácido-lácticas. T-735= es una cepa de bacterias ácido-lácticas epífitas.

Discusión

Se probaron distintas proporciones de *Tithonia diversifolia* (TD) y *Pennisetum purpureum* (PP) para obtener el máximo beneficio para la elaboración de ensilados y para la nutrición animal. Además, como las diferentes proporciones de forrajes en las mezclas de ensilado determinan el contenido de fibra detergente neutra (FDN) y proteína cruda (PC), lo que cambia aún más los parámetros de liberación de metano. En el presente estudio, el aumento de la proporción de PP en las mezclas de ensilado disminuyó la PC y el DMSIV, al tiempo que aumentó los valores de FDN y FDA. Estos resultados están en línea con otros estudios donde los forrajes gramíneos son una fuente de energía fácilmente disponible como carbohidratos fermentativos pero con menores contenidos de proteína que van de 5 a 11 g/100 g^(9,38). Como las características de FDN y FDA están estrechamente relacionados con la ingesta de forraje y la digestibilidad del forraje, estos hallazgos podrían tener implicaciones adicionales en el rendimiento del animal; es decir, los ensilados con altas proporciones de TD serían más apetecibles para los animales y también podrían traducirse en un mayor rendimiento animal debido a un mayor suministro de proteínas y una mejor digestibilidad que los ensilados con una mayor proporción de PP. Por lo tanto, debería ser prudente corroborar estos hallazgos en modelos *in vivo*.

Además, durante el proceso de fermentación ruminal, el material vegetal es colonizado por microorganismos ruminales causando diferentes tasas de degradación dependiendo de la

concentración de carbohidratos estructurales. Se recomienda que, al inicio del proceso de ensilado, no debe haber una limitación de carbohidratos para iniciar el proceso de fermentación; como en el caso de los ensilados con alta proporción de PP. Cuando se produce la acidificación, se produce un agotamiento de los sustratos para el metabolismo de BAL y se inicia la fase de estabilización del ensilado⁽⁸⁾. A pesar de ello, una rápida acidificación de los ensilados es altamente deseable y se promueve mediante el uso de altas proporciones de gramíneas en las mezclas de ensilado. El contenido de proteína es otro parámetro que merece especial atención porque la mayoría de los materiales conservados para la alimentación animal muestran valores bajos de este componente⁽⁶⁾. Aquí, este problema se supera claramente con el uso de TD en las mezclas. Los efectos más significativos se observaron cuando se incluyó TD en proporciones mayores (TD/PP: 100/0 y 67/33), ya que este forraje es una fuente de proteína cruda en los ensilados evaluados. Sin embargo, este efecto es insignificante en tratamientos con mayor proporción de pasto en las mezclas de ensilado (TD/PP: 33/67 y 0/100). Este hallazgo podría ser útil para discriminar el uso de BAL para la acidificación del ensilado. La alta proporción de PP en las mezclas de ensilado podría no requerir la adición de BAL para crear condiciones favorables para facilitar la fermentación del ácido láctico y preservar un contenido moderado de proteína cruda. Por el contrario, para las mezclas de forraje, que necesitan preservar un contenido considerable de proteína cruda, debe ser muy deseable utilizar BAL para prevenir la proteólisis.

Durante la fermentación, los microorganismos ruminales y sus enzimas atacan primero a los carbohidratos fácilmente fermentables. Por lo tanto, la producción de gas después de las primeras 12 h se redujo significativamente en relación con las primeras horas después del ensilado. Es evidente que en las primeras horas de la fermentación una porción del sustrato que contiene azúcares solubles se fermenta inmediatamente; sin embargo, los azúcares solubles generalmente representan sólo una pequeña porción de materiales potencialmente digeribles⁽²⁾. Después de eso, con la colonización de la fibra por bacterias celulolíticas y su degradación, se logra un aumento en la producción de gas. En la derivación de las ecuaciones de Gompertz del presente trabajo, se observó un aumento en la producción de gas a lo largo del tiempo. El comportamiento de la producción acumulada de gas se caracterizó por un aumento en el tiempo de exposición del material vegetal desde los ensilados hasta el ataque de microorganismos. Bezabih *et al*⁽²³⁾ sugieren que este aumento puede interpretarse como un aumento en la actividad microbiana por unidad de alimento, pero no implica ninguna suposición sobre la constancia del rendimiento del crecimiento microbiano. La reducción de la tasa de degradación del sustrato posiblemente está relacionada con la mayor cantidad de pared celular en el ensilado después del punto de inflexión (HPI), disminuyendo aún más la tasa de crecimiento fraccional y, en consecuencia, reduciendo el rendimiento microbiano. En el parámetro de la tasa máxima de producción de gas no se observaron diferencias significativas entre los ensilados preparados exclusivamente de TD (TD/PP: 100/0), los ensilados preparados con bajas proporciones de pasto (TD/PP: 67/33) y los ensilados preparados con alta proporción de pasto (TD/PP: 0/100). Sin embargo, las diferencias fueron

significativas en comparación con los ensilados preparados exclusivamente de pasto, lo que presumiblemente está relacionado con la mayor digestibilidad del material proteínico⁽²⁴⁾ representado en TD. Además, la menor producción de gas está relacionada con la fermentación propiónica como en el caso del ensilado preparado exclusivamente de TD. Para construir una molécula de ácido propiónico es necesario H_2 . En comparación con el ácido propiónico, la producción de acetato y ácido butírico libera H_2 ⁽¹⁶⁾. Por lo tanto, una mayor proporción de PP en las mezclas de ensilado conduciría a la fermentación butírica y acética que se asocia a una mayor producción de CO_2 y metano. Esto tendría una implicación directa en el rendimiento animal, ya que la fermentación propiónica promovería un mejor rendimiento animal debido a una mejor eficiencia en la utilización de la energía de los alimentos.

Es muy recomendable vincular los hallazgos *in vitro* de las emisiones de metano de este estudio para apuntar a una alta productividad animal al tiempo que se mitiga la producción de metano. En contraste con la proporción de TD y PP en las mezclas que modificaron los indicadores de liberación y fermentación de metano, los aditivos de BAL no modificaron estos parámetros. Una razón para esta observación es que BAL tiene el mayor impacto al comienzo del proceso de fermentación con un impacto importante en los carbohidratos fácilmente digeribles para facilitar la acidificación del ensilado, pero este efecto se detuvo durante la fase de estabilización del ensilado sin más efectos sobre otros componentes químicos como FDN o FDA; por lo tanto, se observó un impacto nulo en la liberación de metano⁽⁸⁾. Este hallazgo está en línea con los resultados de Bureenok *et al*⁽¹¹⁾, quienes informaron que no hubo reducción del contenido de FDN en los ensilados de PP tratados con aditivos de BAL con respecto a los ensilados no tratados. Además, dichos autores indicaron que la adición de una fuente rica en carbohidratos fácilmente fermentables modificó el contenido de FDN por un efecto de dilución y por la mejora de la fermentación láctica⁽¹¹⁾.

Es importante tener en cuenta que el rendimiento del crecimiento microbiano varía con factores como la población microbiana, el pH y la disponibilidad de sustratos de N⁽¹³⁾. Está claro que estos factores pueden cambiar durante el período de incubación. Los hallazgos de la presente investigación indican que en el ensilado solo de pasto, la producción de metano es alta, pero puede disminuir a medida que aumenta la inclusión de TD. Esto es consistente con los datos reportados por La O *et al*⁽³⁸⁾, quienes, en mezclas de forraje fresco TD/PP, encontraron una disminución de la producción de metano (166.5, 150.3 y 84.2 ml/g) al agregar TD en las mezclas (15, 30 y 100 %, respectivamente). Claramente, los valores obtenidos en este estudio fueron superiores (hasta 204 ml/g) que los obtenidos por los autores anteriores. Los forrajes con un alto contenido de pared celular representan alimentos de baja calidad, por lo que, dependiendo de la calidad y la composición de la dieta, aproximadamente del 2 al 12 % de la energía bruta (EB) del alimento podría emitirse en forma de CH_4 ^(16,21). El uso de forrajes gramíneos como PP parece aumentar la liberación de metano. Por lo tanto, los beneficios para la producción animal de TD parecen ser el contenido de nitrógeno y un

mayor grado de digestibilidad. Sin embargo, esto debe equilibrarse debido a la capacidad buffer, ya que la acidificación es menor en los ensilados con mayor proporción de gramíneas que comprometerían la ensilabilidad de los forrajes^(10,12). Por lo tanto, el uso de altas proporciones de TD en las mezclas de ensilado aumentaría la capacidad buffer⁽¹²⁾. Este efecto se maximizaría si se observa un alto contenido de proteínas y se activa la capacidad buffer de los grupos amino. Un factor asociado que se debe tener en cuenta es que la capacidad buffer se mejora con altas cantidades de amoníaco (NH₃) debido a la desaminación de la proteína. Además, el alto contenido de fibra de los forrajes también se ha relacionado con una alta capacidad buffer, ya que la capacidad de los componentes de fibra para intercambiar cationes durante el proceso de ensilado puede afectar la capacidad buffer del forraje. Además, la alta temperatura de los ensilados en la apertura está relacionada con la actividad microbiana. Este efecto fue más evidente en los ensilados con proporciones superiores de PP en las mezclas de ensilado. El aumento de la temperatura podría afectar aún más la estabilidad aeróbica de los ensilados después de la exposición del material conservado al oxígeno durante la apertura del silo^(1,8).

Conclusiones e implicaciones

Los ensilados con mayores proporciones de *Tithonia diversifolia* aumentaron el contenido de proteína cruda, la digestibilidad *in vitro* al tiempo que disminuyeron las fracciones de FDN y FDA. Las bajas cantidades de TD mostraron los valores de producción de gas más bajos, mientras que los tratamientos con mayor inclusión de pasto produjeron una mayor cantidad de gas. La producción de metano fue mayor al aumentar la proporción de *Pennisetum purpureum* en las mezclas de ensilado. El inóculo del ensilado no tuvo ningún impacto en la producción de gas *in vitro*. Las proporciones más altas de TD disminuyeron el proceso de acidificación, mientras que la inclusión de PP facilitó valores de pH más bajos. El inóculo de las bacterias ácido-lácticas tendió a disminuir el pH de los ensilados, pero no se observaron efectos claros sobre la temperatura. Los ensilados con proporciones altas de *T. diversifolia* (67 % de inclusión) serían más apetecibles para los animales y también podrían traducirse en un mayor rendimiento animal debido a un mayor suministro de proteínas y una mejor digestibilidad que los ensilados con mayor proporción de *P. purpureum* (67 y 100 % de inclusión). Por lo tanto, debería ser prudente corroborar estos hallazgos en modelos *in vivo*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses contrapuestos.

Agradecimientos

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y a la Universidad del Tolima por el apoyo financiero. El apoyo técnico de Patricia Ávila y Orlando Trujillo del Laboratorio de Calidad de Forrajes del CIAT es muy reconocido.

Literatura citada:

1. Muck RE, Nadeau EMG, McAllister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci* 2018;101(5):3980-4000.
2. Martens SD, Korn U, Roscher S, Pieper B, Schafft H, Steinhöfel O. Effect of tannin extracts on protein degradation during ensiling of ryegrass or lucerne. *Grass Forage Sci* 2019;74(2):284-296.
3. Rao I, Peters M, Castro A, Schultze-Kraft R, White D, Fisher M, *et al.* LivestockPlus: sustainable intensification of tropical forage-based systems for improving livelihood and environmental benefits. *Trop Grassl - Forr Trop* 2015;3(2):59-82.
4. Holguín VA, Ortiz Grisalez S, Velasco Navia A, Mora-Delgado J. Multi-criteria evaluation of 44 introductions of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray in Candelaria, Valle del Cauca. *Rev Med Vet Zoot* 2015;6257-72.
5. Mauricio RM, Ribeiro RS, Silveira SR, Silva PL, Calsavara L, Pereira LG, *et al.* *Tithonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Trop Grassl-Forr Trop* 2014;2(1):82-84.
6. Vega GE, Sanginés GL, Gómez GA, Hernández BA, Solano L, Escalera VF, *et al.* Reemplazo de alfalfa con *Tithonia diversifolia* en corderos alimentados con ensilado de caña de azúcar y pulidura de arroz. *Rev Mex Cienc Pecu* 2019;10(2):267-282.
7. Ribeiro RS, Terry SA, Sacramento JP, Silveira SRE, Bento CBP, da Silva EF, *et al.* *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS One* 2016;11(12):e0165751.

8. Wilkinson JM, Muck RE. Ensiling in 2050: Some challenges and opportunities. *Grass Forage Sci* 2019;74(2):178-187.
9. Holguín VA, Cuchillo HM, Mazabel J, Martens SD. *In-vitro* assessment for ensilability of *Tithonia diversifolia* alone or with *Pennisetum purpureum* using epiphytic lactic acid bacteria strains as inocula. *Acta Sci Anim Sci* 2018;40. e37940 1-7.
10. Holguín VA, Cuchillo HM, Mazabel J, Quintero S, Mora DJ. Effect of a *Pennisetum purpureum* and *Tithonia diversifolia* silage mixture on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission in a RUSITEC system. *Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(1):19-37.
11. Bureenok S, Yuangklang C, Vasupen K, Schonewille JT, Kawamoto Y. The effects of additives in napier grass silages on chemical composition, feed intake, nutrient digestibility and rumen fermentation. *Asian-Australas J Anim Sci* 2012;25(9):1248-1254.
12. Heinritz SN, Martens SD, Avila P, Hoedtke S. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci Technol* 2012;174(3-4):201-210.
13. Martens SD, Hoedtke S, Avila P, Heinritz SN, Zeyner A. Effect of ensiling treatment on secondary compounds and amino acid profile of tropical forage legumes, and implications for their pig feeding potential. *J Sci Food Agr* 2014;94(6):1107-1115.
14. Rabelo CHS, Basso FC, Lara EC, Jorge LGO, Härter CJ, Mari LJ, *et al.* Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant or probiotic on *in vitro* organic matter digestibility, gas production and volatile fatty acids of low dry-matter whole-crop maize silage. *Grass Forage Sci* 2017;72(3):534-544.
15. Macome FM, Pellikaan WF, Schonewille JT, Bannink A, van Laar H, Hendriks WH, *et al.* *In vitro* rumen gas and methane production of grass silages differing in plant maturity and nitrogen fertilisation, compared to *in vivo* enteric methane production. *Anim Feed Sci Technol* 2017;23096-102.
16. Posada SL, Noguera RR. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes (*In vitro* technique of gas production: A tool for feed assesment for ruminants). *Livest Res Rural Dev* 2005;17Art. #36.

17. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1994;48(3):185-197.
18. Tilley JMA, Terry RA. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Grass Forage Sci* 1963;18:104-111.
19. Albores-Moreno S, Alayón-Gamboa JA, Miranda-Romero LA, Alarcón-Zúñiga B, Jiménez-Ferrer G, Ku-Vera JC, *et al.* Effect of tree foliage supplementation of tropical grass diet on *in vitro* digestibility and fermentation, microbial biomass synthesis and enteric methane production in ruminants. *Trop Anim Health Prod* 2019;51(4):893-904.
20. Ku-Vera JC, Valencia-Salazar SS, Piñeiro-Vázquez AT, Molina-Botero IC, Arroyave-Jaramillo J, Montoya-Flores MD, *et al.* Determination of methane yield in cattle fed tropical grasses as measured in open-circuit respiration chambers. *Agric Forest Meteorol* 2018;258:3-7.
21. Haque MN. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *J Anim Sci Technol* 2018;60(1):15.
22. Vélez OM, Gaona RC, Guerrero HS. Propiedades antimetanogénicas *in vitro* de algunas plantas adaptadas a las condiciones de sabana inundable del Departamento de Arauca, Colombia. (*In vitro* antimethanogenic properties of some plants adapted to the floodable savanna conditions of Arauca Department, Colombia). *Trop Subtrop Agroecosyst* 2015;18(3):335-345.
23. Bezabih M, Pellikaan WF, Tolera A, Khan NA, Hendriks WH. Chemical composition and *in vitro* total gas and methane production of forage species from the Mid Rift Valley grasslands of Ethiopia. *Grass Forage Sci* 2014;69(4):635-643.
24. Navarro-Villa A, O'Brien M, López S, Boland TM, O'Kiely P. *In vitro* rumen methane output of grasses and grass silages differing in fermentation characteristics using the gas-production technique (GPT). *Grass Forage Sci* 2013;68(2):228-244.
25. Patra AK. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Front Vet Sci* 2016;3(39).
26. Gemedá BS, Hassen A. *In vitro* fermentation, digestibility and methane production of tropical perennial grass species. *Crop Pasture Sci* 2014;65(5):479-488.

27. Patra A, Park T, Kim M, Yu Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;8(1):13.
28. Hoedtke S, Zeyner A. Comparative evaluation of laboratory-scale silages using standard glass jar silages or vacuum-packed model silages. *J Sci Food Agric* 2011;91(5):841-849.
29. Pieper B, Hoedtke S, Wensch-Dorendorf M, Korn U, Wolf P, Zeyner A. Validation of the Rostock fermentation test as an *in vitro* method to estimate ensilability of forages using glass jar model silages as a basis for comparison. *Grass Forage Sci* 2016;72(3):568-580.
30. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;74(10):3583-3597.
31. Palmquist DL, Jenkins TC. Challenges with fats and fatty acid methods. *J Anim Sci* 2003;81(12):3250-3254.
32. Moore JE. Procedures for the two-stage *in vitro* digestion of forages. In: *Nutrition research techniques for domestic and wild animals*, Harris LE, editor. Vol. 1. Utah State Univ., Logan. 1970.
33. AOAC, Determination of ash in animal feed. Official method 942.05. 18th edition (Chapter 4) ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, DC. USA. 2005.
34. France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, Lopez S, Bannink A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Br J Nutr* 2000;83(2):143-150.
35. Schofield P, Pitt RE, Pell AN. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J Anim Sci* 1994;72(11):2980-2991.
36. García II, Mora-Delgado J, Estrada J, Piñeros R. Kinetics of gas production of fodder of *Moringa oleifera* Lam grown in tropical dry forest areas from Colombia. *Agrofor Syst* 10.1007/s10457-019-00409-0 2019.
37. InfoStat. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2008.

38. La OO, Valenciaga D, González H, Orozco A, Castillo Y, Ruíz O, *et al.* Effect of the combination of *Tithonia diversifolia* and PP vc. Cuba CT-115 in the kinetics and gas production *in vitro*. (In spanish) Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y PP vc. Cuba CT-115 en la cinética y producción de gas *in vitro*. Rev Cubana Cienc Agrí 2009;43:149-152.

Cuadro 1: Valor nutritivo de las mezclas de ensilado de *Tithonia diversifolia* (TD) y *Pennisetum purpureum* (PP) enriquecidas o no enriquecidas con cepas de bacterias ácido-lácticas

Tratamientos	Inóculo	MSA (%±EE)	PC (%±EE)	FDN (%±EE)	FDA (%±EE)	DMSIV (%±EE)	CENIZA (%±EE)
TD/PP: 100/0	T-735	88.0±0.3 ^d	16.8±0.4 ^b	34.9±0.7 ^f	23.1±0.7 ^e	68.9±0.6 ^a	13.2±0.2 ^{de}
	Silall	88.3±0.3 ^{cd}	15.9±0.4 ^{bc}	34.7±0.7 ^f	24.4±0.7 ^e	68.8±0.6 ^a	13.3±0.2 ^{bcde}
	Control	88.9±0.3 ^c	18.1±0.4 ^a	38.6±0.7 ^e	28.1±0.7 ^d	63.9±0.6 ^d	14.1±0.2 ^a
	Promedio	88.4±0.2 ^b	16.9±0.3 ^d	36.1±0.4 ^a	25.24±0.7 ^a	67.2±0.3 ^b	13.5±0.1 ^{ab}
TD/PP: 67/33	T-735	87.9±0.3 ^{de}	12.7±0.4 ^d	40.8±0.7 ^d	28.3±0.7 ^{cd}	68.3±0.6 ^{ab}	13.2±0.2 ^{cde}
	Silall	87.2±0.3 ^e	12.3±0.4 ^d	41.7±0.7 ^{cd}	28.7±0.7 ^{cd}	66.6±0.6 ^c	12.9±0.2 ^e
	Control	87.8±0.3 ^{de}	15.1±0.4 ^c	43.3±0.7 ^c	30.0±0.7 ^c	66.7±0.6 ^c	13.6±0.2 ^{abcd}
	Promedio	87.6±0.2 ^a	13.4±0.3 ^c	41.9±0.4 ^b	29.0±0.4 ^b	67.2±0.3 ^b	13.2±1.2 ^a
TD/PP: 33/67	T-735	88.5±0.3 ^{cd}	8.6±0.4 ^e	49.1±0.7 ^b	33.4±0.7 ^b	65.8±0.6 ^c	13.9±0.2 ^a
	Silall	89.1±0.3 ^{bc}	9.0±0.4 ^e	41.7±0.7 ^{cd}	34.0±0.7 ^b	67.1±0.6 ^{bc}	12.9±0.2 ^e
	Control	88.4±0.3 ^{cd}	8.4±0.4 ^e	43.3±0.7 ^c	34.4±0.7 ^b	67.4±0.6 ^{abc}	13.6±0.2 ^{abcd}
	Promedio	88.7±0.2 ^b	8.7±0.3 ^b	44.7±0.4 ^c	33.9±0.4 ^c	66.8±0.3 ^b	13.5±0.1 ^{ab}
TD/PP: 0/100	T-735	89.9±0.3 ^{ab}	5.3±0.4 ^f	57.3±0.7 ^a	38.1±0.7 ^a	64.0±0.6 ^d	13.7±0.2 ^{ab}
	Silall	89.8±0.3 ^{ab}	5.1±0.4 ^f	57.9±0.7 ^a	38.3±0.7 ^a	63.0±0.6 ^d	14.0±0.2 ^a
	Control	90.6±0.3 ^a	5.1±0.4 ^f	58.9±0.7 ^a	39.1±0.7 ^a	63.8±0.6 ^d	13.7±0.2 ^{abc}
	Promedio	90.1±0.2 ^c	5.2±0.3 ^a	58.0±0.4 ^d	38.5±0.4 ^d	63.6±0.3 ^a	13.8±0.1 ^b

TD/PP= proporciones de *Tithonia diversifolia*/*Pennisetum purpureum* [Base de materia fresca (MF)]. MSA= materia seca analítica; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutra; FDA= fibra detergente ácida; DMSIV; Digestibilidad de la materia seca *in vitro*. T-735= es una cepa de bacterias ácido-lácticas epífitas. Silall es una mezcla comercial de inóculo de bacterias ácido-lácticas.