

Comunidades bacterianas en ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas y su relación con la calidad y la digestibilidad enzimática *in vitro* en cerdos

Jenny Patricia Guerrero López

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2013

Comunidades bacterianas en ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas, y su relación con la calidad y la digestibilidad enzimática *in vitro* en cerdos

Jenny Patricia Guerrero López

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Producción Animal

Directora:

SIRIWAN MARTENS Dr. Agr. Asesora Técnica en la oficina de Estado Medio Ambiente, Agricultura y Geología. Sajonia

Codirectora:

LUZ STELLA MUÑOZ. Zoot., PhD. Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia sede Palmira

Línea de Investigación:

Producción Animal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 19 días del mes de Junio de 2013, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: ARNOBIO LÓPEZ y GUSTAVO REYES

Para calificar la Tesis de Grado de:

JENNY PATRICIA GUERRERO LÓPEZ

Titulada:

“LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN ENSILAJES DE FORRAJES TROPICALES (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) Y BATATA (*Ipomoea batatas*) SU RELACION CON LA CALIDAD DE LOS ENSILAJES Y LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO PARA CERDOS)” bajo la dirección de Siriwan Martens, PhD y Luz Stella Muñoz, PhD

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores: ARNOBIO LÓPEZ y GUSTAVO REYES, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO

REPROBADO

ARNOBIO LÓPEZ

GUSTAVO REYES

Agradecimientos

La culminación de este trabajo fue un proceso que llego a feliz término por la participación de personas que con su valioso aporte hicieron posible la realización del mismo, por tanto quiero agradecer de una manera muy especial a aquellos que de una manera u otra, aportaron a mi proceso de formación profesional y personal.

A mi madre, mi esposo y mi hija, por su paciencia y sacrificio durante esta etapa de mi vida, por su amor y apoyo que siempre me animo a continuar.

A mis tutores de trabajo de grado Dra. Siriwan Martens, investigadora en Nutrición Animal del CIAT. Y a la Dra. Luz Stella Muñoz, Profesora Asociada de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, por confiar en mí, y concederme la oportunidad de trabajar con ellas, aprovechando su amplio conocimiento.

A los jurados por sus grandes aportes a la investigación.

A mis amigas y amigos

Finalmente, agradezco a todos los integrantes del Programa de Forrajes y personal en general del CIAT, y a la Universidad Nacional por su apoyo y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

Los ensilajes son generados por procesos fermentativos, es decir procesos microbiológicos. El éxito de un buen ensilaje depende, principalmente, de una cantidad suficiente de bacterias ácido lácticas (BAL) (homofermentativas y heterofermentativas) y el contenido de carbohidratos hidrosolubles presente en los forrajes. La estructura de las comunidades bacterianas fue visualizada por perfiles de PCR-SSCP amplificando los genes 16S rDNA extraídos directamente de ensilajes de forrajes tropicales, y teñidos con plata. En este estudio se encontraron 6 bacterias conocidas como referencia (*Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Burkholderia glumae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Agrobacterium tumefaciens*) y 11 desconocidas.

Basados en los resultados de identificación de grupo de análisis, estos perfiles mostraron una similitud de 54.1% entre las mezclas y las edades de corte, estos perfiles revelaron 3 grupos que se encuentran influenciados por las especies: *Ipomoea*, *Canavalia* y *Vigna* (I, II y III respectivamente)

La mayor digestibilidad *in vitro* de los ensilajes fue para *Ipomoea*, teniendo en cuenta que la batata (*Ipomoea batata*) posee menos lignina, la mayor digestibilidad la presentó la asociación *Vigna*-*Ipomoea*, (grupo I) seguida por, *Canavalia*-*Ipomoea*, confirmando que las leguminosas poseen mayor cantidad de lignina que los forrajes.

Palabras Claves: bacterias ácido lácticas, PCR-SSCP, ensilaje, *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*, *Ipomoea batata*

ABSTRACT

The silages are generated by fermentation processes, which are microbiological processes. The success of a good ensilage mainly depends on a sufficient amount of lactic acid bacteria (LAB) and the content of soluble carbohydrates present in the feed; the LAB may be divided into homofermentative and heterofermentative. In this study 6 known bacteria were found (*Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Burkholderia glumae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Agrobacterium tumefaciens*) and 11 unknown.

Based on the results of cluster analysis identification of these profiles, they showed a similarity of 54.1% between cutting ages and mixes, these profiles revealed three clusters that are influenced by the species: *Ipomoea*, *Canavalia* and *Vigna* (I, II and III, respectively)

The higher *in vitro* digestibility of the silage was for *Ipomoea*, due to the fact that the sweet potato (*Ipomoea batata*) has a lower lignin content, the higher digestibility was presented by the *Vigna-Ipomoea* association (cluster I) followed by, *Canavalia-Ipomoea*, confirming that legumes have a higher amount of lignin than forages (Van Soest, 1964).

Keywords: Lactic acid bacteria, PCR-SSCP, silage, *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*, *Ipomoea batata*

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	4
1.1. LA PORCICULTURA EN COLOMBIA.....	4
1.2. USO DE ENSILAJES DE FORRAJES PARA ALIMENTAR ANIMALES NO-RUMIANTES.....	5
1.3. ENSILAJE.	7
1.4. BIOQUÍMICA DE LOS ENSILAJES.	8
1.5. INTERÉS AGRONÓMICO DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO.	9
1.5.1. <i>Vigna unguiculata</i>	9
1.5.2. <i>Canavalia brasiliensis</i>	12
1.5.3. <i>Ipomoea batata</i>	14
1.6. MICROFLORA EPIFITICA (EXISTE SOBRE LA PLANTA)	16
1.7. BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO.	16
1.8. INDICADORES DE LA CALIDAD DE LOS ENSILAJES.....	18
1.8.1. <i>Características nutricionales</i>	18
1.8.2. <i>Características fermentativas</i>	21
1.9. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA MATERIA SECA (DIVMS).	25
1.9.1. <i>Factores que inciden en la Digestibilidad</i>	25
1.10. TÉCNICAS MOLECULARES.....	26
1.10.1. <i>Extracción de ADN utilizando CTAB</i>	27
1.10.2. <i>Amplificación Parcial de los genes SSU rRNA Bacteriales Por PCR</i>	28
1.10.3. <i>Preparación de ADN de Cadena Sencilla</i>	29
1.10.4. <i>Sistema del Gel, Electroforesis y la Tinción</i>	29
2. MATERIALES Y METODOS	30
2.1. LOCALIZACIÓN.	30
1. <i>Valor nutricional y calidad de los ensilajes de leguminosas y el tubérculo y sus combinaciones a diferente edades de corte</i>	30
2. <i>Caracterización molecular de las Bacterias presente en los ensilajes</i>	30
2.2. ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS.....	30
2.2.1. <i>Material biológico</i>	31
2.2.2. <i>Materia Seca de la Muestra Fresca (MSi)</i>	31
2.2.3. <i>Determinación de Cenizas Totales y Materia Orgánica (MO)</i>	31
2.2.4. <i>Determinación de Proteína Cruda</i>	32
2.2.5. <i>Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Acida (FDA)</i>	32
2.3. ANÁLISIS DE LOS ENSILAJES.....	33
2.3.1. <i>Proceso De Ensilaje</i>	33
2.3.2. <i>Liofilización del Material</i>	34
2.4. INDICADORES DE LA CALIDAD DE LOS ENSILAJES:	34
2.5. SENSORIALES.....	34
2.5.1. <i>Indicadores organolepticos</i>	34
2.6. QUÍMICOS:	34
2.6.1. <i>Determinación de pH</i>	35
2.6.2. <i>Determinación de Ácidos Orgánicos</i>	35
2.6.3. <i>Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total (NH3-NT)</i>	36
2.7. VALOR NUTRICIONAL DE LOS ENSILAJES	37

2.7.1.	<i>Materia Seca Corregida (MScorr)</i>	37
2.7.2.	<i>Digestibilidad de los Ensilajes</i>	37
2.8.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BAL EN ENSILAJES.....	39
2.8.1.	<i>Extracción de ADN Total</i>	40
2.8.2.	<i>Cuantificación del ADN</i>	40
2.8.3.	<i>Amplificación parcial de los genes SSU rRNA Bacteriales Por PCR</i>	40
2.8.4.	<i>Purificación de Productos PCR</i>	41
2.8.5.	<i>Digestión con Exonucleasa Lambda (λ)</i>	42
2.8.6.	<i>Perfiles Genéticos por SSCP</i>	42
2.8.7.	<i>Sistema del Gel, Electroforesis y la Tinción</i>	42
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
3.1.	ANÁLISIS QUIMICO DE LAS MATERIAS PRIMAS.....	44
3.1.1.	<i>Materia Seca</i>	44
3.1.2.	<i>Proteína</i>	45
3.1.3.	<i>Fibra Detergente Neutra</i>	46
3.1.4.	<i>Fibra Detergente Acida</i>	47
3.1.5.	<i>Capacidad Buffer</i>	48
3.1.6.	<i>Composición química de las especies a ensilar</i>	49
3.2.	CALIDAD DE LOS ENSILAJES.....	50
a.	<i>Sensoriales</i>	50
3.2.1.	<i>Calidad Organoléptica</i>	50
b.	<i>Químicos</i>	51
3.2.2.	<i>Indicador de Acidez pH</i>	51
3.2.3.	<i>Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total (NH₃-NT)</i>	52
3.2.4.	<i>Ácidos Orgánicos</i>	53
3.2.5.	<i>Análisis de la calidad de los ensilajes</i>	56
3.3.	ANÁLISIS QUIMICO DE LOS ENSILAJES.....	57
3.3.1.	<i>Materia Seca Corregida</i>	57
3.3.2.	<i>Cenizas</i>	58
3.3.3.	<i>Digestibilidad de los ensilajes</i>	59
3.3.4.	<i>Composición Nutricional de los ensilajes</i>	60
3.4.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BAL EN LOS ENSILAJES.....	61
3.4.1.	<i>Extracción de ADN y Amplificación de los genes 16S</i>	62
3.4.2.	<i>Análisis Por SSCP</i>	63
4.	CONCLUSIONES	67
4.1.	ANÁLISIS QUIMICO DE LAS MATERIAS PRIMAS.....	67
4.2.	CALIDAD DE LOS ENSILAJES.....	67
4.3.	VALOR NUTRICIONAL DE LOS ENSILAJES.....	67
4.4.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	68
	BIBLIOGRAFÍA	69
	ANEXOS	80

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Abreviaturas	Término
ABA	Alimentos Balanceados para Animales.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
APS	Persulfato de Amonio.
BAL	Bacterias Acido Lácticas.
bp	Pares de bases.
CHS	Carbohidratos Hidrosolubles.
CIAT	Centro Internacional De Agricultura Tropical.
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio.
DGGE.....	Electroforesis En Gel Con Gradiente Desnaturalizante.
FDA	Fibra Detergente Acida.
FDN	Fibra Detergente Neutra.
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento.
MO	Materia Orgánica.
MS	Materia Seca.
MSi	Materia Seca inicial.
PC	Proteína Cruda.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RFLP	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción.
RNA	Ácido Ribonucleico.
SSCP	Polimorfismo en la Conformación de Cadena Sencilla.
TGGE	Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura.

Unidad SI	Definición
L	Litros.
mL	Mililitros.
μ l	microlitros.
$^{\circ}$ C	grados Celsius.
kg	Kilogramo.
g	Gramos.
ng	Nanogramos.
min	Minutos.
nm	Nanómetros.
rpm	Revoluciones por minuto.
mM	Milimolar
mA	Miliamperios

Lista de Figuras.

Figura 1. Extracción de ADN total de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, con diferente edad de corte. Utilizando Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB).62

Figura 2. Amplificación de la región 16S rDNA de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, utilizando los primers universales com1 y com 2-Ph* (*contiene un grupo fosfato en el terminal 5').63

Figura 3. Perfiles SSCP producidos por amplificación de PCR del gen 16S rDNA de muestras de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, con diferentes edades de corte. En la línea 1,13 y 25 marcador de comunidad compuesto por: *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Burkholderia glumae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Agrobacterium tumefaciens*.64

Figura 4. Análisis de similaridad de perfiles de SSCP producidos por amplificación de PCR del gen 16S rDNA de muestras de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, con diferentes edades de corte como se muestra en la figura 3. Usando GelCompar II. Marcador de comunidad en las posiciones f. (*Lactobacillus plantarum*), d. (*Lactobacillus brevis*), j. (*Agrobacterium tumefaciens*), c. (*Flavobacterium johnsoniae*), e. (*Burkholderia glumae*) y a. (*Rhizobium trifolii*).65

Lista de Tablas.

Tabla 1. Caracterización de primers usados por SSCP basados en análisis de comunidades bacterianas.	41
Tabla 2. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Materia Seca inicial (Msi).....	44
Tabla 3. Valores de Proteína Cruda para las interacciones: fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas a diferentes edades de corte.....	45
Tabla 4. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Fibra Detergente Neutra FDN.	46
Tabla 5. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas, con respecto a Fibra Detergente Acida FDA.	47
Tabla 6. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Capacidad Buffer.	48
Tabla 7. Composición Química-Nutricional (sobre % MS) de los forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas.....	49
Tabla 8. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Calidad Organoléptica.	50
Tabla 9. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a pH.	51

Tabla 10. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total NH ₃ -NT.	52
Tabla 11. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto al Ácido Acético.	53
Tabla 12. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto al Acido Propionico.	54
Tabla 13. Efecto entre las interacciones: Estado de madurez, Fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Acido Butírico.....	55
Tabla 14 . Composición Química Nutricional (sobre % MS) de los forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas.	56
Tabla 15. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Materia Seca Corregida por perdidas de acidos grasos.....	57
Tabla 16. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a Cenizas.	58
Tabla 17. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas con respecto a la DIVMS.....	59
Tabla 18. Composición Química Nutricional (sobre % MS) de los forrajes tropicales (<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Canavalia brasiliensis</i>) y batata (<i>Ipomoea batata</i>) y sus mezclas.....	60

Lista de Anexos.

Anexo A. Description of the DLG-key	80
Anexo B. Solución Fibra Detergente Neutro.....	81
Anexo C. Solución Fibra Detergente Acida.....	81
Anexo D. Protocolo Extracción con CTAB.....	81
Anexo E. Condiciones para la amplificación de la región 16S rDNA	82
Anexo F. Programa para la amplificación de la región 16S rDNA.....	83
Anexo G. Protocolo Wizard® PCR Preps DNA Purification Resin (Promega Corporation).....	83
Anexo H. Condiciones para la digestión con enzima Lambda exonucleasa	84
Anexo I. Protocolo Limpieza con Fenol-Cloroformo.....	85
Anexo J. Concentración Del Gel MDE	85
Anexo K . Protocolo de Tinción Plata.....	86
Anexo L. TBE 10X	86
Anexo M. Buffer de Extracción.....	87
Anexo N. Buffer de Carga 2X (Amersham, 1994).....	87
Anexo O. Geles de agarosa.....	87
Anexo P. Solución Fijadora o de parada.....	88

Anexo Q. Solución Reveladora.....	88
Anexo R. Solución Tiosulfato.....	88
Anexo S. Solución nitrato de plata.....	88
Anexo T. Protocolo de Digestibilidad in vitro.....	89
Anexo U. Solución KH ₂ PO ₄ 0.1 M.....	89
Anexo V. Solución Na ₂ HPO ₄ 0.1 M.....	90
Anexo W. Buffer Fosfato 0.1M pH 6.0.....	90
Anexo X. Solución KH ₂ PO ₄ 0.2 M.....	90
Anexo Y. Solución Na ₂ HPO ₄ 0.2 M.....	91
Anexo Z. Buffer Fosfato 0.2M pH 6.8.....	91
Anexo AA. Solución Pepsina.....	91
Anexo BB. Solución Cloranfenicol.....	91
Anexo CC. Solución Pancreatina Porcina.....	92

INTRODUCCIÓN

En los trópicos todavía es escaso alimentar rumiantes con forrajes ensilados, pero aún más inusual usarlo en raciones de animales monogástricos. Frecuentemente la alimentación de cerdos se basa en concentrados, que pueden poseer materias primas de alto costo, generando un incremento en los precios de la carne (Acosta, E. S.; Ribera, R.; Botero, R.; Taylor, R., 2005) (ACP, 2009). En la actualidad hay gran interés, por parte de los medianos y pequeños productores porcícolas, en incluir alternativas en sus raciones, con el propósito de mitigar uno de los principales problemas en éstas producciones pecuarias, como son, los altos costos en la producción que alcanzan el 74.74 % del costo total (ACP, 2011), y a su vez obtener un incremento en su comportamiento productivo y reproductivo (Dung, et al., 2002). Lo anterior dificulta la adquisición de ingredientes a precios favorables por parte de personas de escasos recursos, lo que hace que dicha actividad no tenga la rentabilidad esperada.

Es por esto, que se justifica la búsqueda de alternativas de alimentación más económicas y rentables que sustituyan parcialmente, el uso de concentrados comerciales y/o la utilización de materias primas. Lo especial es que la búsqueda ha tenido como misión dejar el uso por parte del propio animal como respuesta final para decidir el empleo o no de un nuevo alimento, además de usar las condiciones de estudio *in vitro* con preferencia respecto a otras *in situ*.

Una alternativa nutricional sería la utilización de forrajes, que se pueden fermentar como ensilajes. El proceso disminuye factores anti-nutricionales presentes en algunas leguminosas y permite conservar los forrajes para aquellos períodos del año en donde son escasos (Nguyen Nhut, et al., 2002) ya que los ensilajes son productos fermentativos de un proceso

microbiológico. Para mejorar la calidad de los alimentos y minimizar el deterioro de los mismos, la caracterización de microorganismos epifíticos involucrados es útil.

El objetivo de este proyecto es caracterizar las comunidades bacterianas presentes en los ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*), mediante técnicas moleculares PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) y relacionar los microorganismos presentes con la calidad y el valor nutritivo utilizando la técnica de digestibilidad enzimática *in vitro*.

OBJETIVOS

General:

Caracterizar las comunidades microbianas presentes en los ensilajes y evaluar su relación con el valor nutritivo utilizando la técnica de digestibilidad enzimática *in vitro* en el cerdo.

Específicos:

Caracterización molecular de las comunidades bacterianas presentes en los materiales ensilados empleando la técnica molecular PCR-SSCP.

Mediante la técnica de digestibilidad *in vitro*, evaluar el valor nutricional de los ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y el tubérculo batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas.

1. MARCO TEORICO.

1.1. La Porcicultura En Colombia.

Actualmente la porcicultura colombiana enfrenta grandes limitaciones; el sector presenta un aumento en los costos de producción por aumento en los precios de alimentos balanceados y en los fletes para trayectos alternos a los afectados, debido a las pérdidas ocasionadas por el fenómeno climático presente en los últimos años (Ministerio de Agricultura, 2012).

Estos elevados costos de producción, son explicados en gran medida por la alta participación del costo del alimento el cual representa el 74,09% del costo de producción ciclo completo (ACP, 2011). Este está directamente relacionado con el acceso a materias primas como el maíz y la soya que presentan graves problemas de abastecimiento interno además de sus altos precios (ACP, 2009).

Las importaciones de maíz amarillo con destino a la industria productora de alimentos balanceados para animales es del 75%. Y en promedio el 65.5% de este maíz es consumido por la industria porcícola (FENALCE, 2011), (ACP, 2011).

Una de las características principales del sector porcícola es la búsqueda de fuentes de alimentos disponibles y económicos que logren generar mayor rentabilidad a los productores. Lo especial es que la búsqueda ha tenido como misión dejar el uso del propio animal como respuesta final para decidir el empleo o no de un nuevo alimento, y usar las condiciones de estudio *in vitro* con preferencia con respecto a otras *in situ*.

1.2. Uso De Ensilajes De Forrajes Para Alimentar Animales No-Rumiantes.

Según(Ravindran, et al., 1987), (Ravindran & Brair, 1992), (Phuc & Lindberg, 2000, p. 4),(Nguyen Nhut, et al., 2002) los forrajes y subproductos agrícolas, pueden ser potencialmente utilizados en la alimentación de cerdos, con el fin de obtener producciones económicamente más rentables.

La composición química y la estructura de la fibra vegetal varían con la fuente de fibra (Van Soest, 1978),(Nguyen Nhut, et al., 2002). En cerdos en crecimiento, las fuentes de fibra con paredes celulares lignificadas son más resistentes a la actividad microbiana, y más eficaces en el aumento del volumen fecal y la reducción del tiempo de tránsito de la digesta(Sandoval, et al., 1987).

Según (Ehle, et al., 1982) La capacidad del cerdo para digerir y utilizar la fibra se ve afectada por la fuente de la fibra y el contenido de lignina. El grado de digestibilidad de la fibra depende sobre todo del origen de la fibra y en menor medida de la cantidad de fibra en la dieta. La hemicelulosa es a menudo más fácil de digerir en animales no rumiantes que la celulosa debido al efecto de hidrólisis de ácido en hemicelulosa y a la estructura química intrínseca de la celulosa(Ehle, et al., 1982).

Los cerdos aprovechan parte de los forrajes, gracias al intestino grueso desarrollado; éste último alberga una abundante microflora que fermenta las fibras de los forrajes y transforma los carbohidratos en ácidos grasos volátiles que son utilizados como fuente energética por el cerdo(Ehle, et al., 1982).

En todo el mundo ha sido usual alimentar los rumiantes con forrajes ensilados, pero rara vez se han empleado en raciones para animales monogástricos como

los cerdos (Machin, D., H., 1999),(Heinritz, S. N.; Hoedtke, S.; Martens, S. D.; Peters , M.; Zeyner, A., 2012).

Está demostrado que incluir forrajes, entre ellos ensilajes, en raciones de cerdas preñadas mejora su comportamiento reproductivo al mejorar el bienestar del animal (Machin, D., H., 1999). Esto explica porque estas cerdas sufren estrés al recibir raciones muy reducidas de alimento concentrado (aprox. 2,2 kg) cuando su apetito real requeriría una ración de aprox. 5,4 kg. El objetivo es saciar el apetito del animal sin permitirle que su condición corporal aumente en demasía, puesto que dicha condición se asocia a problemas reproductivos. Los forrajes ensilados serían alimentos ideales bajo estas circunstancias, ya que las cerdas digerirían en el intestino delgado todos los componentes que pueden ser degradados enzimáticamente, y luego, por fermentación que ocurre en el intestino grueso, digerir la porción fibrosa y absorber los productos restantes. Lo que permite saciar el apetito, reducir la privación y mantener un peso adecuado, con lo que se mejora el comportamiento reproductivo, se prolonga la vida reproductiva y se baja el costo de la alimentación(Machin, D., H., 1999)

El uso de forrajes ensilados puede ser de gran beneficio para el pequeño productor para alimentar sus cerdas preñadas y sus cerdos en crecimiento y en finalización(Sarria , P.; Montoya, C.; Yusti, L. M.; Orejuela, I.; Guevara, M.; Cruz, A. C.; Arredondo , J.; Londoño, A.; Peters, M., 2010),(Carvajal, 2010),(Heinritz, S. N.; Hoedtke, S.; Martens, S. D.; Peters , M.; Zeyner, A., 2012),(Ortega, Einar Artiles ; Hoek, Rein Van Der; Orozco, Raciél Lima ; Rodríguez, Carlos ; Hoedtke, Sandra ; Sarria, Patricia ; Martens, Siriwan, 2012). Este sistema no se puede recomendar para cerdas lactantes por el requerimiento de alta concentración nutritiva que impone la producción de leche(Machin, D., H., 1999).

1.3. Ensilaje.

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAL) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen a la putrefacción(Elferink, et al., 1999).

El éxito del proceso fermentativo que ocurre en los ensilajes depende, principalmente, de una cantidad suficiente de BAL eficientes y de una concentración adecuada de carbohidratos solubles en el forraje que genera el ácido láctico. De esta manera, el pH baja rápidamente y se mantiene bajo, preservando mejor el ensilaje (Jaster, 1995), (Tobia & Vargas, 2000),(Tobía, et al., 2003).

En los ensilajes el porcentaje de fibra y el grado de lignificación de los mismos dependerá de la fecha de corte(Gorosito, 1997).

Según,(**McDonald, et al., 1991**)(**McDonald & Henderson, 1962**)(**Bolsen & Brent, 2007**) las leguminosas están consideradas inapropiadas para el ensilaje debido a tres factores principales: Son altamente tamponantes, tienen bajo contenido de carbohidratos hidrosolubles y de MS, debido a los elevados contenidos de proteína, por esta razón, es necesario añadirle una fuente de carbohidratos solubles, con la finalidad que las BAL aceleren el proceso fermentativo, incrementándose, así la producción de ácidos grasos volátiles (principalmente ácido láctico y, en menor grado, ácido acético); lo que le confiere un olor agradable al producto ensilado. Esto se puede observar en las mezclas con *Ipomoea*

1.4. Bioquímica de los Ensilajes.

Los procesos de ensilaje se pueden dividir en cuatro fases:

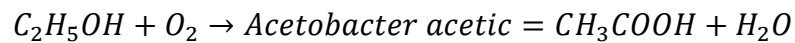
Fase 1. Aeróbica. En esta fase que dura sólo pocas horas, el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además hay una actividad importante 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 (6,0-6,5)(Elferink, et al., 1999)(Tobia & Vargas, 2000).

Fase 2. Fermentativa. Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico. Dura de varios días hasta varias semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad BAL proliferará y se convertirá en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0(Elferink, et al., 1999)(Tobia & Vargas, 2000).

Fase 3. Estable. Mientras se mantenga el ambiente sin aire, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas (Tobia & Vargas, 2000). Sólo algunas proteasas y carbohidrasas, y microorganismos especializados, como *Lactobacillus buchnerique* toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo (Elferink, et al., 1999).

Fase 4. Deterioro Aeróbico. Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje. El período de deterioro puede dividirse en dos etapas:

1. **Degradación** de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras que asimilan ácido láctico y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético como el *Acetobacter* que transforma el alcohol en presencia de poco oxígeno en ácido acético.



Esto induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa

2. **Deterioro**, en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos facultativos (mohos y enterobacterias). El deterioro aeróbico ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire (Wilkinson & Davies, 2012).

1.5. Interés agronómico de las especies en estudio.

1.5.1. *Vigna unguiculata*.

Familia: Fabaceae (alt. Leguminosae)

Subfamilia: Faboideae

Tribu: Phaseoleae

Subtribu: Phaseolinae . También se coloca en: Papilionaceae.

Nombres comunes:

Frijol, caupí, guisante sureño, presa de tua, kunde, caupí, blackeye guisante, alacín, pericillo, caritas, cabecita negra, macassar frijol, frijol de cuerda, fríjol (Venezuela), Augenbohne o Kuhbohne (Alemania).

Distribución:

Originaria de: África Occidental, donde la mayor diversidad genética y las formas más primitivas de la naturaleza *V. unguiculata*, pueden ocurrir fue probablemente el centro primario de domesticación.

Hoy en día, se cultiva en los trópicos y subtrópicos entre 35° N y 30° S, a través de Asia y Oceanía, Oriente Medio, el sur de Europa, África, el sur de EE.UU., América Central y América del Sur.

Usos / aplicaciones:

Caupí es una de las leguminosas más utilizadas en el mundo tropical. El grano se utiliza ampliamente para la nutrición humana.

La especie tiene un alto potencial como abono verde.

Caupí tiene el potencial de hacer un excelente heno

Valor nutricional:

Valores de proteína bruta del 24.6 y 24.8%, valores bajos de extracto etéreo del 1.1 y 1.4%, de cenizas del 4.6 y 4.5%, y de fibra detergente ácida del 6.5% y 7.4%, respectivamente(Castro, 2013)(Peters, M; Franco, L. H.; Schmdit, A. e Hincapie, B, 2011.)

Requerimientos de suelo:

Adaptado a una amplia gama de suelos de arenas a las arcillas pesadas y bien drenados, con preferencia por los suelos más ligeros que permiten un buen enraizamiento. Amplia gama de pH como muy ácida (pH 4), suelos de baja fertilidad. Mejor adaptado a los suelos fuertemente ácidos. Crece bien también en suelos muy alcalinos textura pesada. No tolera la inundación prolongada o salinidad.

Temperatura:

Muy sensible a las heladas, crece bien sólo en estaciones cálidas con 25-35 °C como óptima temperatura. Crece desde el nivel del mar hasta los 1.500 msnm, dependiendo de la latitud.

Toxicidad:

Para animales monogástricos, inhibidores de la tripsina y algo de contenido de taninos deben tenerse en cuenta. Un máximo del 20-25% en la dieta, sin tratamiento, no parece causar problemas. El tratamiento térmico reduce inhibidores de la tripsina.

El potencial de producción:

La Materia Seca

Vegetativo producción de MS 3-10 t / ha en 8-12 semanas, la producción de cereales 250-4,000 kg / ha.

Fortalezas:

Leguminosa multi-propósito proporcionando hoja, grano y forraje.

Mejora la fertilidad del suelo.

Facilidad de establecimiento.

Muy alto valor nutritivo y de alta palatabilidad.

Tolerante a la sequía

Altos rendimientos en un corto período de tiempo.

Alta producción de semilla.

Limitaciones:

Plagas y enfermedades susceptibilidad de acogida para las plagas de Phaseolus frijol.(Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M. and Schultze-Kraft, R., 2005)

1.5.2. *Canavalia brasiliensis*.

Familia: Fabaceae (alt. Leguminosae)

Subfamilia: Faboideae

Tribu: Phaseoleae

Subtribu: Diocleinae. También se coloca en: Papilionaceae.

Distribución:

Originaria de: Una especie del Nuevo Mundo con una amplia distribución natural, que se extiende desde el norte del Trópico de Cáncer, en Sinaloa, México a 27 °S en el noreste de Argentina. Hay tres principales centros de distribución en (a) América Central, México y el Caribe, (b) Paraguay, noreste de Argentina y sur de Brasil, y (c) el noreste de Brasil.

Usos / aplicaciones:

Principalmente como abono verde y control de la erosión. En las regiones más pobres del noreste de Brasil, las semillas se utilizan como alimento en épocas de baja disponibilidad de alimentos.

Requerimientos de suelo:

Crece bien en una amplia gama de suelos, desde muy ácido (pH 4,3) a alcalino (pH 8.0) y está adaptado para condiciones de baja fertilidad.

Valor nutritivo:

Hay poca información sobre la calidad del forraje de *C. brasiliensis* y no hay ensayos de alimentación. De acuerdo con un estudio, la biomasa contiene 44,5% de C; 3,71% de N; 33,5% del ADF; 44,1% NDF; 10,6% de hemicelulosa; 6,52% de lignina; 8,42% de polifenoles; la digestibilidad in vitro de la Materia Seca es de 69,6%. Relación C / N es de 12-16.

Las semillas contienen proteína cruda de 31,9 a 41,6%, el 52,3% de carbohidratos, fibra cruda 12.3%, 2.8% de cenizas y el 1,2% de aceite.

C. brasiliensis tiene un alto contenido de lisina y podría ser utilizado como un componente en los concentrados para aves de corral y cerdos.

Toxicidad:

Alrededor del 35% de nitrógeno total es nitrógeno no proteico, con el canavanin aminoácido tóxico que contribuye la mayor parte. La concentración de la canavanin en la semilla es de aproximadamente 5% de MS. El mecanismo de su efecto anti-nutricionales aún no está claro, sin embargo, se supone que canavanin actúa como un anti-metabolito de arginina. Otros componentes antinutritivos incluyen los inhibidores de la tripsina, concaavalina Br, canavanin y canatoxin. La lectina concaavalina Br forma aproximadamente el 20% de la proteína total.

El potencial de producción:

Materia Seca 5 a 10 t / ha / año.

Fortalezas:

Tolerante a sequía

La adaptación a una amplia gama de suelos, incluyendo suelos ácidos de baja fertilidad.

Alto potencial como abono verde y conservación de suelos.

Limitaciones:

Compuestos antinutricionales y tóxicos (Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M. and Schultze-Kraft, R., 2005)

1.5.3. *Ipomoea batata*.

Especies

Ipomoea batatas (L.) Lam. [Convolvulaceae]

Nombres comunes: batata. Camote o papa dulce.

Usos / aplicaciones:

Papa dulce (*Ipomoea batatas*) se cultiva para la alimentación en más de 100 países. Se utilizan como vegetal y pueden ser hervidos, al horno, frito (para hacer patatas fritas), se seca y se muele en harina para hacer galletas, pan y otros productos de pastelería. Pueden ser cocidos y congelados. Tapas de hoja también se comen como verdura

Alimentación de cerdos y ganado

Los tubérculos pueden ser fermentados y producen alcohol.

El potencial de producción:

Los rendimientos promedio de los tubérculos son 5 t / ha en África, 10 t / ha en América del Sur y 16 t / ha en Asia.

Distribución:

Se cree que el centro de origen de la papa dulce se encuentra entre la península de Yucatán de México y la desembocadura del río Orinoco, en Venezuela. Batatas tan antiguas como 8000 años se han encontrado en Perú. A continuación, se ha extendido hacia el Caribe y la Polinesia. En la actualidad se cultiva entre los 40 °N y 32 °S, hasta 2000 m (y hasta 2800 m en las regiones ecuatoriales).

Requerimientos de suelo:

El camote crece en suelos francos bien drenados, con alto contenido de humus que proporciona un entorno cálido y húmedo, a las raíces. El pH óptimo del suelo es entre 5 y 7

El camote es medianamente tolerante a la sequía y pueden sobrevivir períodos de sequía.

Valor nutritivo:

Tubérculos de patata dulce son principalmente una fuente de energía debido a su alto contenido en hidratos de carbono, que representa el 80-90% del peso seco. Estos hidratos de carbono constan de almidón, azúcares y pequeñas cantidades de pectinas, hemicelulosa y celulosa.

El almidón es el carbohidrato principal (aproximadamente el 75% de MS) y es muy resistente a la hidrólisis por amilasa. Cocinar aumenta la fracción de almidón fácilmente hidrolizable de la patata dulce del 4% al 55%. El contenido de azúcar puede ser muy variable, por lo general entre el 1 y el 12% de MS, El contenido de materia seca de los tubérculos frescos es aproximadamente el 30% y hasta 45% Los tubérculos son una fuente pobre de proteína, ya que contienen aproximadamente 4% de MS de proteína cruda - menos de la mitad del grano de maíz - y son bajos en lisina y aminoácidos azufrados Tienen un bajo contenido de fibra (7% DM de NDF), grasas y cenizas.

Toxicidad:

Factores antinutricionales

Tubérculos de patata dulce contienen niveles medios de inhibidores de tripsina Que son suficientes para disminuir la digestibilidad de la proteína en las dietas Las raíces pueden contener ipomoein, que tiene propiedades laxantes.(Heuzé, et al., 2012).

1.6. Microflora Epifítica (existe sobre la planta)

Existen cuatro grupos de microorganismos importantes en las reacciones de fermentación del ensilaje

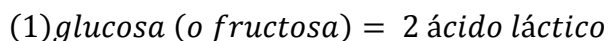
- Bacterias productoras de ácido láctico (*Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*)(Pang, H.; Zhang, M.; Qin, G.; Tan, Z; Li, Z; Wang, Y.; Cai, Y., 2011).
- Bacterias formadoras de endosporas (*Clostridium* y *Bacillus*)
- Bacterias coliformes (*Aerobacter*, *Enterobacter* y *Echericha*)
- Hongos, levaduras (*Torulopsis* y *Micoderma*) y hongos filamentosos(*Absidia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillum* y *Trichoderma*)
- Ocasionalmente se encuentran bacterias formadoras de ácido propiónico (*Veilonella* y *Listeria*).

La microflora encontrada en los ensilajes es muy diferente a la encontrada en el pasto fresco. Factores como madurez de la planta, condiciones climáticas y tecnología de cosecha afectan esta microflora, debido a sus efectos en la composición de la planta y la disponibilidad de nutrimentos(Elferink, et al., 1999).

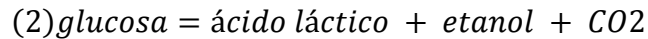
1.7. Bacterias Productoras de Ácido Láctico.

(Lyhs, 2002). Divide las BAL en tres grupos de acuerdo con sus características fermentativas: las homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas, y las heterofermentativas facultativas.

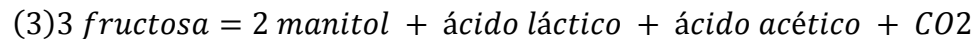
Las BAL homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Reúnen especies como: *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus ruminis*.



Los heterofermentativos estrictos degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Incluyen *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosauceus*, *Enterococcus faecium*



Los facultativos heterofermentativos fermentan las hexosas a ácido láctico y puede producir CO₂ a partir del gluconato pero no de la glucosa. Ellos también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético incluyen miembros del género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* como *L. brevis*, y *L. buchneri* (Cussen, Robert; Neira, Lya, 1998), (Elferink, et al., 1999).



Con el ensilaje hasta hoy se asocian cuatro géneros principales de bacterias formadoras de ácido láctico: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Pang, H.; Zhang, M.; Qin, G.; Tan, Z; Li, Z; Wang, Y.; Cai, Y., 2011).

Los miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* son poco patogénicos, mientras que algunos miembros del género *Streptococcus* pueden causar serias enfermedades en el hombre y en los animales.

La presencia de los diferentes géneros de bacterias productoras de ácido láctico y su población total depende de la maduración del ensilaje; el *Lactobacillus* tiende a ser el género dominante cuando el ensilaje madura (Chaverra & Bernal, 2000). Algunos estudios han podido comprobar que bacterias de este género, ricas en contenidos de Guanina – Citocina (G-C) (34-54%) (Ehrmann & Vogel, 2005) son beneficiosas para la salud

animal, tienen acción probiótica, antimicrobiana y de biopreservación (Samaniego & Sosa del Castillo, 1998)

La inhibición de la proliferación de bacterias indeseables se asocia con la tasa de producción de ácido láctico durante el ensilaje, lo que depende de la población inicial de bacterias del ácido láctico homofermentativas, disponibilidad de sustrato en el ensilaje y la capacidad buffer del forraje (Elferink, et al., 1999).

1.8. Indicadores de la calidad de los ensilajes.

Tradicionalmente se han utilizado una serie de indicadores físico químicos para medir la calidad de los alimentos ensilados. Dentro de estos indicadores se encuentran Porcentaje de Materia Seca (%MS), pH, cantidad de ácidos orgánicos (acético, láctico y butírico), pérdidas de material ensilado (por putrefacción entre otros), cantidad de nitrógeno amoniacal que se produce como indicador de proteólisis e indicadores organolépticos (color, olor, textura y grado de humedad).

1.8.1. Características nutricionales.

1.8.1.1. Materia seca (MS).

La materia seca es importante como controladora de la calidad del proceso fermentativo. Indica que cuando el contenido de MS en el material a ensilar sobrepasa el 25%, se reduce el nivel de efluentes y las pérdidas de carbohidratos por esta vía; además disminuye las pérdidas por respiración,

permite un predominio de las bacterias ácido-lácticas y un pH adecuado. Su valor óptimo para la conservación se sitúa entre 30 y 35% (Vallejo, 1995). También es importante porque los demás componentes están expresados sobre materia seca.

1.8.1.2. Compuesto Nitrogenado.

Estos inciden sobre la calidad fermentativa y sobre el valor nutritivo. En el forraje fresco, entre el 75 y 90% del nitrógeno total se encuentra como proteína, mientras que el resto está en forma no proteica, sin embargo, durante la conservación esta proporción cambia considerablemente. En un ensilaje mal conservado, 75% o más del nitrógeno puede solubilizarse, principalmente en forma de amoníaco, además de la pérdida que representa en el valor nutritivo de la proteína, estos cambios se oponen a la disminución del pH, dificultando la estabilidad del ensilaje, cuando un forraje tiene menos del 7% de proteína en base seca, el consumo y la digestibilidad de los nutrientes se ven afectados por la falta de nitrógeno. (MacDonald, et al., 1968)

1.8.1.3. Cenizas Totales.

Estas son controladoras del proceso de cosecha, en casi todos los forrajes esta fracción es inferior al 10%. Si supera este valor, hay fuertes sospechas de contaminación con tierra

Se denominan Cenizas totales a la materia inorgánica o contenido mineral que forma parte de los alimentos. Las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica (AOAC, 1990)

1.8.1.4. Fibra Detergente Acida(FDA) yFibra Detergente Neutra (FDN).

La fibra se encuentra formada por 3 fracciones principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, en cantidades muy variables, que dependen principalmente del tipo de forraje y la edad.

La fibra tiene diferente valor nutritivo para los rumiantes que para los no rumiantes, dado que la celulosa y hemicelulosa presentes, por lo general son bien digeridas gracias a la flora ruminal, mientras que en los animales no rumiantes son prácticamente no digeribles. Existen métodos para determinar el nivel de fibra en el alimento, lo que permite su inclusión en la dieta para cerdos. Se utilizan fibra detergente ácida(FDA) y fibra detergente neutra (FDN) como indicadores de calidad, dada su correlación con la digestibilidad de la muestra, su valor energético y el consumo voluntario del alimento.

La FDN es la fracción del forraje que corresponde a las paredes celulares y, está asociada, negativamente con la ingestión de materia seca. El porcentaje de FDN se incrementa con el estado de madurez de los forrajes. El residuo que se recoge teóricamente es la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina que contienen las paredes celulares del forraje.

La FDA, como su nombre indica, nos determina el contenido de celulosa y lignina no solubles de la muestra analizada. En teoría, y, por diferencia con la FDN, nos aporta información sobre la parte de hemicelulosa y celulosa no lignificadas y, por tanto, que pueden ser degradadas por los microorganismos. En general, entre mayor contenido celular y menor porcentaje de FDN, la muestra tiene mayor digestibilidad (Caravaca, F. P.; Castel, J. M.; Guzman, J. L.; Delgado, M.; Mena, Y.; Alcalde, M. J.; Gonzalez, P., 2003).

1.8.2. Características fermentativas.

1.8.2.1. Indicadores organolépticos.

Esta es una evaluación basada en la apreciación subjetiva de la calidad de un ensilaje a través de los sentidos. Los parámetros a considerar son: olor, color, textura y grado de humedad. La exactitud de este método está sujeta a la experiencia del evaluador (DLG, 1997) (Tobia & Vargas, 2000).

1.8.2.2. Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total (NH₃-NT).

Es un indicador de la calidad de preservación del material. El nivel de N-NH₃ se relaciona inversamente con la concentración de carbohidratos solubles de la planta original. Es decir, las leguminosas forrajeras y las gramíneas en estados tempranos de desarrollo y con bajos contenidos de azúcares y alto contenido de proteína producen, al ensilarse, una cantidad de ácido insuficiente para evitar el desarrollo de clostridios responsables de fermentaciones secundarias que transforman el ácido láctico en butírico y degradan proteínas y aminoácidos especialmente bajo condiciones de pH alto aumentando el nivel de N-NH₃.

Para poder evaluarlo se hace necesario expresar el nitrógeno amoniacal como porcentaje del nitrógeno total del ensilaje, para dar una aproximación de la proporción de las proteínas que han sido desdobladas.

El valor óptimo de NH₃-NT que requiere un ensilaje agradable y catalogado con muy buenas características es una concentración menor a 7% (Ojeda, et al., 1991), (Vallejo, 1995).

1.8.2.3. Ácidos Orgánicos.

1.8.2.3.1. Ácido Láctico.

Dentro de los ácidos orgánicos formados durante la fermentación, el ácido láctico es el más importante, por la alta acidez que induce en el medio, además por ser el resultado del metabolismo de las bacterias más eficientes y adaptadas entre todas las presentes en los ensilajes, lo que permite cumplir una acción bactericida, conservando mejor el ensilaje(Ojeda, et al., 1991). Para obtener una adecuada fermentación láctica se necesita la presencia de tres elementos: un medio ambiente anaeróbico, un sustrato adecuado para las bacterias ácido lácticas y una suficiente cantidad de bacterias de este tipo(Muck, 1988)(Vallejo, 1995)

El valor de ácido láctico que requiere un ensilaje agradable y catalogado como de excelentes características es por encima del 5.0%(Betancourt, et al., 2005)

1.8.2.3.2. Ácido Acético.

El acético se produce a través de distintas vías: por la metabolización de aminoácidos por bacterias proteolíticas; metabolización de las hexosas por bacterias heterolacticas; metabolización de las pentosas y los ácidos orgánicos de la planta por bacterias heterolacticas y homolacticas y metabolización de las hexosas por las bacterias heterolacticas, enterobacterias y levaduras, principalmente por *Acetobacter*. Ácido cuya eficacia conservadora no es muy notable debido a su escasa capacidad acidificante

El valor de ácido acético que requiere un ensilaje agradable y catalogado como de óptimas características es una concentración menor del 1.8%(Ojeda, et al., 1991),(Vallejo, 1995).

1.8.2.3.3. Ácidos:Butírico, Isobutírico y Propiónico.

Estos ácidos son producido únicamente por el metabolismo de bacterias indeseables del genero *Clostridium* razón por la que constituye uno de los mejores indicadores para determinar la calidad fermentativa de los ensilajes. En los ensilajes bien conservados estos ácidos no debe estar presente, ya que ello indica que ha habido proliferación de las bacterias clostrídicas, principalmente del grupo proteolítico. Estas bacterias metabolizan los aminoácidos liberados por la solubilización de las proteínas y le dan malos olores y sabores a los ensilajes, lo que produce un rechazo en los animales, además promueven la formación de amoníaco el cual por su poder neutralizante, impide que el pH se estabilice y alcance valores bajos.

El valor aceptable de estos ácidos que requiere un ensilaje para ser catalogado como de buenas características está en concentraciones inferiores a 0.1% (Ojeda, et al., 1991), (MacDonald, et al., 1968), (Vallejo, 1995).

1.8.2.4. Indicador de Acidez (pH).

El pH es un indicador de vital relevancia en el proceso de conservación de un forraje en forma de ensilaje debido a que es una de las transformaciones más radicales que ocurre en el forraje y por su estrecha relación con los procesos degradativos durante la conservación. Es un parámetro rápido e indicativo del tipo de fermentación que tuvo lugar y nos indica, por tanto, si disponemos de un alimento estable. Es necesario que el descenso del pH ocurra lo más pronto posible para garantizar un hábitat desfavorable para las bacterias clostrídicas y reducir la respiración evitando así la proteólisis y la proliferación de los

microorganismos indeseables en el proceso(Vallejo, 1995),(Muck, 1988),(Tobia & Vargas, 2000).

Estudios realizados por (Vallejo, 1995) muestran que el valor óptimo de pH está directamente relacionado con el contenido de MS del ensilado, en ensilados con contenidos de 40% de MS un pH óptimo será $\leq 4,87$

El valor de pH está en función de la materia seca del ensilaje y de la proporción que exista entre las proteínas y los carbohidratos solubles, se considera que cuando un ensilaje alcanza valores inferiores a 4.2 se ha logrado su estabilidad fermentativa(DLG, 1997)(Muck, 1988),(Vallejo, 1995).

1.8.2.5. Capacidad Buffer (CB).

La capacidad buffer (CB) en plantas forrajeras es definida como la resistencia que presenta la planta a las variaciones de pH. La capacidad buffer depende básicamente de la composición de la planta en cuanto a proteína bruta, iones inorgánicos (Ca, K, Na) y la combinación de ácidos orgánicos (Jobim, et al., 2007). O la cantidad de mili-equivalentes de H^+ gastados para llevar el pH de un forraje o un ensilaje desde 6.0 hasta 4.0(MacDonald, et al., 1968).

Al aumentar la edad de la planta se incrementa la proporción tallo/hoja, con lo cual los procesos metabólicos disminuyen. Como consecuencia, se reduce el contenido de ácidos orgánicos, lo que conlleva un descenso de la capacidad buffer con la maduración (De la Roza, 2005). Cuanto mayor sea el poder buffer más ácido láctico será necesario que se forme en el ensilado para poder bajar el pH y mayor cantidad de azúcares fermentables será necesaria para poder proporcionar dicho ácido láctico (Cañete, M. V. ; Sacha, J. L., 1998).

1.9. Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca(DIVMS).

La DIVMS, Indica indirectamente cuánto alimento quedará retenido en el tracto gastrointestinal para ser digerido; La digestibilidad de los alimentos puede ser estimada por métodos que simulen el proceso de digestión; los métodos *in vitro* para estimaciones a nivel de laboratorio de la degradación de los alimentos son importantes para los nutricionistas. Un eficiente método de laboratorio debe ser aplicable y se debe correlacionar bien con los parámetros de medición *in vivo*. Los métodos *in vitro* tienen la ventaja no solo de ser menos costosos y menos demorados, sino que permiten mantener las condiciones experimentales más precisas que en los ensayos realizados *in vivo*(Makkar, 2004).Sin embargo necesitan una verificación a nivel *in vivo*. Los métodos *in vitro* pretenden simular la digestión de los alimentos en el estómago y duodeno de los monogástricos. La cantidad de nutriente que se solubiliza durante la incubación es una estimación de la digestibilidad(Bindelle, et al., 2007).

El método para digestibilidad *in vitro* de la materia seca propuesto por (Boisen & Fernandez, 1997) es un método multienzimático, que tiene 2 incubaciones sucesivas El primer paso simula la digestión en el estómago,una hidrólisis enzimática con una solución de pepsina a pH 2.0 en presencia de cloranfenicolque es un agente antimicrobial, este paso es seguido por hidrolisis con pancreatina a pH 6,8 que simula la digestión obtenida en el intestino delgado(Bindelle, et al., 2007),(Boisen & Fernandez, 1997).

1.9.1.Factores que inciden en la Digestibilidad.

Los factores que afectan la digestibilidad pueden agruparse en 3 grandes grupos. El primero de ellos está representado por aquellos que están ligados directamente con el animal. Y el segundo grupo corresponde a los factores que

están relacionados con el alimento(Buxade, Carlos M., 1994).El otro grupo está directamente relacionado con el ambiente.

Entre los factores ligados al animal, la especie resulta ser el más importante,la raza, la edad, el estado fisiológico y capacidad de ingesta no parecen tener por si tanta importancia sobre la digestibilidad de los alimentos.

De los factores ligados al alimento podemos destacar: El nivel de alimentación, la composición química, el estado vegetativo de la planta,palatabilidad, textura, el método de conservación, la composición de la ración(Buxade, Carlos M., 1994),yel sistema de procesamiento del alimento (Montoya & Leterme, 2011).

Entre los factores relacionados con el ambiente tenemos: La temperatura, presión atmosférica (que afecta directamente el consumo animal), la conversión alimenticia y el consumo de agua.

1.10. Técnicas Moleculares.

Según (Muck, 2012)en los últimos 10 años, cambios dramáticos han ocurrido en la forma en que se estudia la microbiología del ensilaje. Veinticinco años atrás, el conocimiento de lo ocurrido en el silo, estaba limitado a lo que crecía en los diferentes medios selectivos, y la identificación de las especies en placas de agar, esto era un trabajo tedioso.

Hoy en día, aúnse tienen problemas con la comprensión “causa y efecto” en el silo. Sin embargo hay mejores herramientas para saber que microorganismos han estado involucrados en el proceso de ensilaje.

Hasta la fecha un número de técnicas de perfiles genéticos están disponibles, de las cuales DGGE/TGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante/ electroforesis en gel con gradiente de temperatura) (Peters, et al., 2000)y T-RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de

restricción)son las más utilizadas (Dohrmann & Tebbe, 2004),(Smalla, et al., 2007),(Schmalenberger, et al., 2008),(James, et al., 2001).Estas requieren el uso de un gran cebador de PCR (Polymerase Chain Reaction) con alto contenido de GC (guanina- citosina) esto con el fin de evitar la separación completa del filamento durante la electroforesis(Schwieger & Tebbe, 1998).

Actualmente se viene trabajando con SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) que se desarrolló por primera vez para la investigación diagnóstica de detección de mutaciones o variaciones alélicas del gen, de los organismos eucariotas. Sin embargo, este método se ha aplicado casi sin modificaciones para caracterizar las comunidades microbianas menos complejas (Dohrmann & Tebbe, 2004),(Peters, et al., 2000).

En esta técnica electroforética, el ADN de cadena sencilla se pliega en estructuras secundarias (conformaciones) de acuerdo con su secuencia de nucleótidos y su entorno físico-químico (temperatura y fuerza iónica) debido a las diferentes movilidades electroforéticas, diferentes conformaciones pueden ser separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante (Schwieger & Tebbe, 1998).Esto la hace potencialmente más simple que los DGGE/TGGE.Y la ventaja sobre los análisis RFLPes que puede detectar polimorfismos de ADN y mutaciones puntuales en una variedad de posiciones de fragmentos del ADN(Orita, Masato; Iwahana, Hiroyuki; Kanazawa, Hiroshi; Hayashi, Kenshi; Sekita, Takao, 1989).

1.10.1. Extracción de ADN utilizando CTAB.

La búsqueda de un eficiente método de extracción significa más ADN de mayor calidad y rendimiento.Esto ha llevado al desarrollo de una variedad de protocolos, sin embargo los fundamentos de extracción de ADN siguen siendo

los mismos. El ADN debe ser purificado de material celular de una manera que impida la degradación.

Estudios realizados muestran diferentes métodos de extracción de los cuales CTAB resultó ser el método elegido para obtener ADN de alto peso molecular, con gran pureza, libre de inhibidores o contaminantes (Sanabria, et al., 2009),(James, et al., 2001), (Cheng & Jiang, 2006),(Porebski, et al., 1997).

1.10.2. Amplificación Parcial de los genes SSU rRNA Bacteriales Por PCR.

Con el propósito de eliminar el problema de heteroduplex (cadenas que no emparejan 100% puesto que algunos de sus nucleótidos son distintos) y para reducir el número de señales que se generan a partir de cada organismo individual de una comunidad microbiana, la PCR se realiza con primers universales ordinarios (no fosforilados) Com1 (avance) y un primer 5'-fosforilado Com2-Ph (Reverse) que amplifican la región 16S rDNA gen bacteriano presente en todos los organismos procariontes(Schwieger & Tebbe, 1998), (Schmalenberger, et al., 2008),(James, et al., 2001).

La cantidad de ADN molde que se utiliza para la PCR es un factor importante. La PCR puede ser inhibida por altas cantidades de ADN no específico, por co-extracción de ácidos húmicos, se deben incluir pasos adicionales de purificación o la adición de compuestos que mejoran el rendimiento de la reacción de PCR(Dohrmann & Tebbe, 2004).

1.10.3. Preparación de ADN de Cadena Sencilla.

A partir de los productos de PCR la hebra fosforilada puede ser selectivamente eliminada (digerida) con la enzima Lambda exonucleasa (Dohrmann & Tebbe, 2004).

La proteína Exo del fago λ es una exonucleasa que degrada ADN lineal en dirección 5'-3'. Estudios *in vitro* demuestran que puede degradar hasta 1000 pares de bases por segundo, aunque depende del contenido de bases nucleotícas del ADN, así como de cambios estructurales del complejo ADN-Enzima (Santoyo, 2008).

1.10.4. Sistema del Gel, Electroforesis y la Tinción.

Los productos tratados con la enzima exonucleasa se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida MDE® Gel Solución (Lonza Rockland, 50620ME, USA) (Schwieger & Tebbe, 1998). Es una matriz que tiene una alta sensibilidad con las diferencias conformacionales del ADN, y que durante el proceso de tinción usa una solución de nitrato de plata para impregnar el gel. El revelado se logra por la reducción selectiva de los iones plata a plata metálica por formaldehído en medio alcalino, produciendo bandas de color marrón oscuro. La sensibilidad es su gran ventaja. Entre las desventajas se encuentra el alto costo, y el hecho de ser un método laborioso y lento (Widjojoatmodjo, et al., 1994).

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Localización.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia en el Laboratorio de Nutrición Animal, así:

1. Valor nutricional y calidad de los ensilajes de leguminosas y el tubérculo y sus combinaciones a diferentes edades de corte.
2. Caracterización molecular de las Bacterias presente en los ensilajes.

2.2. Análisis de las Materias Primas.

Para el análisis de las características químicas de los forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial con 3 fuentes de variación: forrajes, formas de suministro y edades de corte (3x2x4) para un total de 24 tratamientos, con 3 repeticiones por tratamiento, a través del procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.2 para Linux (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.) Para determinar si existía o no diferencia estadística, las variables evaluadas fueron: Materia Seca inicial (MSi), Fibra Detergente Acida (FDA) Fibra Detergente Neutra (FDN) y capacidad buffer (CB).

2.2.1. Material biológico.

En los terrenos del CIAT Colombia, se cultivaron los forrajes, se prepararon los ensilajes se estimó la calidad de los ensilajes y se caracterizó las comunidades bacterianas.

Para la caracterización química de las materias primas se utilizaron 2 leguminosas herbáceas *Vigna unguiculata* CIAT 4555 y *Canavalia brasiliensis* CIAT17009 y un bulbo, *Ipomoea batata* variedad Tainun. Y sus mezclas para un total de 6 tratamientos. Las leguminosas fueron evaluadas en cuatro diferentes edades: *Vigna* se cortó a las 6 (pre florescencia), 8 (floración), 10 (post-floración) y 12 (las vainas de maduración) semanas de crecimiento; *Canavalia* se cortó a las 8, 12, 16 y 20 semanas de crecimiento (sin observar etapas generativas distintas) Los forrajes fueron desecados al sol hasta alcanzar una materia seca (MS) aproximada de 35% y luego picados. Cada 6, 8, 10, 12, 16 y 20 semanas los tubérculos de batata fueron cosechados, lavados, picados y secados hasta alcanzar una materia seca del 35 %. A los 24 tratamientos antes de ensilar se les realizó la siguiente caracterización química: Materia Seca inicial (MSi), Cenizas, Fibra Detergente Ácida (FDA) y Fibra detergente Neutra (FDN)

2.2.2. Materia Seca de la Muestra Fresca (MSi).

Para determinar la materia seca se pesaron 100 g, los cuales se colocaron a 60°C hasta un peso constante (24 horas); se determinó el peso antes y después de la desecación y se calculó el porcentaje de materia seca.

2.2.3. Determinación de Cenizas Totales y Materia Orgánica (MO).

Después de la desecación a 105°C se introducen de nuevo los crisoles con la materia seca a la mufla a 500°C durante 3 horas y se determina el peso antes y después de la desecación.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{[(\text{peso del crisol} + \text{muestra}) - \text{peso de crisol vacío}]}{\text{peso muestra seca}} * 100$$

$$\% \text{ de Materia orgánica} = 100 - \% \text{ de cenizas en base seca}$$

2.2.4. Determinación de Proteína Cruda.

El método que se utilizó para determinar la cantidad de proteína es el método Kjeldahl (AOAC, 1990). Este es un método indirecto, realmente lo que se determina es la cantidad de nitrógeno presente en la muestra. Una vez conocido este, al multiplicar la cantidad de nitrógeno obtenida por el factor 6,25 se obtiene la cantidad de proteína cruda del ensilaje.

2.2.5. Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA).

Se utilizó el método descrito por (Goering & Van Soest, 1970) para calcular la FDN; se colocaron 0.5 g de muestra en 100 mL de solución detergente Neutra Anexo B a pH neutro, se hirvieron por 1 hora y filtraron en crisoles Gooch, se determinó el peso antes y después; se lavó con agua y luego con acetona al 50% y se colocó a 105°C por toda la noche.

$$\% \text{ FDN} = \frac{[(\text{peso del crisol} + \text{muestra}) - \text{peso de crisol vacío}]}{\text{peso muestra}} * 100$$

Para la FDA se siguió el mismo protocolo con una solución detergente ácida a pH ácido. Anexo C

$$\% FDA = \frac{[(\text{peso del crisol} + \text{muestra}) - \text{peso de crisol vacío}]}{\text{peso muestra}} * 100$$

2.3. Análisis de los ensilajes.

Para el análisis de las características químicas y físicas de los ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y su mezclas, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial con 3 fuentes de variación: forrajes, formas de suministro y edades de corte (3x2x4) para un total de 24 tratamientos, con 3 repeticiones por tratamiento, a través del procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.2 para Linux (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.) para determinar si existía o no diferencia estadística. Las variables evaluadas fueron: Materia Seca corregida (MScor), pH, Ácidos orgánicos (acético, Propiónico y butírico), Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total (NH₃-NT) y Calidad Organoléptica (Color, Olor y Textura)

2.3.1. Proceso De Ensilaje.

Los 24 tratamientos fueron ensilados en tubos de PVC de 1,8 l de volumen con tres repeticiones. Seis tratamientos se aplicaron: *Vigna unguiculata* CIAT 4555 o *Canavalia brasiliensis* CIAT17009 solas, *Vigna* más *Canavalia* proporción 1:1 *Vigna* o *Canavalia* mezclada con las batatas en proporción de 1:1 con base a la masa fresca, e *Ipomoea batata* variedad Tainun sola, se ensilaron después de un almacenamiento de aproximadamente 3 meses a ~25 ° C.

2.3.2.Liofilización del Material.

Las muestras fueron liofilizadas a 8×10^{-3} mbar y -40 °C, por 48 horas (Labconco Freeze Dry System Lyph-Lock® 6 #77520, Kansas City, Missouri). Se molieron y una parte fue macerada en morteros estériles hasta obtener un polvo fino para la extracción de ADN de cada una de las muestras. Se guardaron 100 mg en tubos Eppendorf de 2 mL previamente esterilizados, y se almacenaron a -20°C , hasta el momento de la extracción.

2.4. Indicadores de la calidad de los ensilajes:

2.5. Sensoriales

2.5.1.Indicadores organolépticos.

Seles evaluaron las características organolépticas (color, olor y textura). La evaluación se produjo al momento de destapar los micro silos, teniendo en cuenta la tabla de evaluación de ensilajes propuesta por (DLG, 2006) Hasta 4 puntos se considera podrido, 5 - 9, malo, 10- 13 promedio, 14 - 17 buenos y 18 - 20 excelente calidad Anexo A.

2.6. Químicos:

2.6.1.Determinación de pH.

El pH se determinó con un peso de 10 g de la muestra en un vaso de precipitados y añadiendo 100 mL de agua destilada. Después de 2 h, el pH se determinó utilizando un medidor de pH (Mettler-Toledo GmbH: MP120 pH metro, Schwerzenbach, Suiza), calibrado para cada periodo de medición.

2.6.2.Determinación de Ácidos Orgánicos.

Los ácidos orgánicos fueron determinados por HPLC de acuerdo a la metodología propuesta por (Siegfried, et al., 1984). Las muestras de ensilajes se dejaron descongelar completamente a temperatura ambiente (22 °C) antes del análisis. 50 g de muestras y 200 mL de agua HPLC se mezclaron en un Stomache (Modelo STO-3500, Stomacher Lab-blender, Teckmar, Cincinnati, OH) durante 4 min. Las muestras fueron filtradas a través de cuatro capas de gasa. Luego fueron mezcladas a fondo, y 50 mL submuestras se transfirieron a tubos para centrifuga de 50 mL. Las muestras fueron luego acidificadas (pH <3) con 18.9 µL de H₂SO₄ 0.1 M, se agitaron y se centrifugaron (AccuSpin 1R Fisher Scientific, Osterode Germany) a 3000 rpm durante 10 min. En tubos para centrifuga de 2mL se sacaron alícuotas de 2 mL, se filtraron en unidad de filtración (Millex®-HV en PVDF, 0,45 µm de poro, 13 mm de diámetro, MERCK MILLIPORE. Sao Paulo, Brasil) usando una columna de análisis para ácido orgánico (Rezex™ ROA-Organic Acid H + (8%) 00H-138-K0, 300 x 7.8 mm, Phenomex, Torrence, CA, USA.) y 0,005 N H₂SO₄ como fase móvil, y un flujo de 0,5 mL/min y el horno entre 45 y 75°C.

2.6.3. Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total (NH₃-NT).

Se estimó la relación nitrógeno amoniacal en relación al nitrógeno total (N-NH₃/Nt). En los filtrados por la técnica de micro-difusión modificada descrita por (Voigt & Steger, 1967) Las muestras de ensilajes se dejaron descongelar completamente a temperatura ambiente (22 ° C) antes del análisis. 50 g de muestras y 200 mL de agua HPLC se mezclaron en (Modelo STO-3500, Stomacher Lab-blender, Teckmar, Cincinnati, OH) durante 4 min, Las muestras fueron filtradas a través de cuatro capas de gasa. Luego fueron mezcladas a fondo, y se tomó 1 mL del extracto de ensilaje en el pequeño beaker para la microdifusión con 1 mL de la solución aturada de carbonato de potasio (K₂CO₃) y en el Erlenmeyer se le adiciono 4 mL de la solución de ácido bórico, tiempo después se cerró el Erlenmeyer y se movió suavemente. Esta mezcla se dejó reposar por 24 horas, posteriormente se tituló con 0.01N de HCl.

$$Ac = U * F$$

Ac = Concentración de amonio NH₃ en mg en 1 mL de extracto de ensilaje

U = Gasto de 0.01N de HCL en mL.

F = 0.17 mg/mL (1 mL 0.01 N HCL neutraliza 0,17 mg de NH₃)

$$\%NH_3(\text{extracto}) = \frac{Ac * 100}{1000}$$

$$D = \frac{W + FS - MS}{FS}$$

D = Factor de dilución del extracto del ensilaje.

W = Adición de agua en mL.

Peso fresco del ensilaje en g por extracto.

Materia seca del ensilaje en FS en g.

$$\% NH_3 \text{ en una sustancia orgánica} = D * NH_3 (\text{extracto})$$

2.7. Valor Nutricional de los ensilajes

2.7.1. Materia Seca Corregida (MScorr).

Para las pérdidas de ácidos grasos volátiles que ocurre al ensilar (Weissbach & Kuhla, 1995) considerael cálculo para la corrección de MS la siguiente formula:

$$MSc = 2,08 + 0,975 MS$$

2.7.2. Digestibilidad de los Ensilajes.

Para el análisis de digestibilidad de los ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y su mezclas, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial con 3 fuentes de variación: forrajes, mezclas y edades de corte (3x2x4) para un total de 24 tratamientos a través del procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.2 para Linux (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.) para determinar si existía o no diferencia estadística. La variable evaluada fue: Digestibilidad Invitro de la Materia Seca (DIVMS).

2.7.2.1. Localización.

En el Laboratorio de Nutrición de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA, se estimó el valor nutritivo de los ensilajes de forrajes tropicales.

2.7.2.2. Protocolo pre digestión *In Vitro* en Cerdos. (Pepsina/Pancreatina).

Los análisis se realizaron de forma consecutiva. Veinticuatro (24) muestras se montaron con cuatro repeticiones y dos muestras en blanco se midieron para un total de 26 muestras por sesión

2.7.2.3. Digestión Gástrica (Pepsina).

Se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada (1 mm tamaño de partícula); se suspendieron en una solución buffer de fosfato (25 mL 0.1M pH 6,0), y una solución de HCl (10mL 0.2M). Esto se mezcló en matraces de Erlenmeyer. El pH se ajustó a 2.0 con HCl 1 M o NaOH 1 M y 0,5 mL de una solución de cloranfenicol (Sigma C-0378) (0,5 g 100 mL etanol) se añadió una solución de pepsina fresca (1 mL, 25 mg/mL, pepsina porcina: (2000. FIP U / g, Merck 7190) se añadió finalmente. Los erlenmeyers se cerraron con papel parafilm y se colocaron durante 2 horas bajo agitación suave en un baño de agua a $39 \pm 0,5$ °C

2.7.2.4. Digestión dentro del intestino delgado (pancreatina).

Después de la hidrólisis con pepsina, 10 mL de una solución tampón de fosfato (0,2 M, pH 6,8) y 5 mL de una solución de NaOH (0,6 M) se añadieron a la solución. El pH se ajustó a 6,8 con HCl 1 M o NaOH 1 M y la solución de pancreatina fresca (1 mL, 100 mg de pancreatina (Sigma P-1750) mL) se añadió. Los Erlenmeyer se cerraron luego con papel parafilm y se colocaron durante 4 horas bajo agitación suave en un baño de agua a $39 \pm 0,5$ °C

2.7.2.5. Cálculos de Digestibilidad Enzimática de la MS (Estómago e Intestino Delgado).

Después de la hidrólisis, los residuos se recogieron por filtración sobre una tela de Nylon (42 micras usando crisoles filtrantes de porosidad 2 (P₂)), se lavó con etanol (2mL x 10 mL de etanol al 95%) y acetona (2mL x 10 mL de acetona al 99,5%); se secaron durante 24 horas a 60 ± 1°C y se pesaron.

$$\%DivMS = \frac{(P_{muestra} \times Ms) - [(crisol + residuos) - crisol]}{P_{muestra} \times MS} \times 100$$

%DivMS = Porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la materia seca

2.8. Caracterización molecular de BAL en ensilajes.

La similaridad de los perfiles de las comunidades bacterianas de ensilajes tropicales y los análisis de grupos para los perfiles SSCP fueron realizados con el software GelCompar II (versión 6.0; Applied Maths, Belgium). Los patrones de SSCP individuales fueron normalizados usando un marcador de comunidad estándar que contenía una mezcla de ADN de cadenas simples de *Rizhobium trifolii*, *Lactobacillus brevis*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Lactobacillus plantarum* CIAT S 66.7, *Agrobacterium tumefaciens* y *Lactobacillus fermentum*.

El cálculo de la matriz de similaridad fue basado en coeficiente de correlación de Pearson como podrían ser calculadas con GelCompar II. El método de agrupación por dendrogramas por grupos similares fue UPGMA (método no ponderado por grupo utilizando medias aritméticas).

2.8.1.Extracción de ADN Total.

Se utilizó extracción de DNA con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB):siguiendo el protocolo de extracción empleado por (Porebski, et al., 1997)con pequeñas modificaciones por el laboratorio de Patología de Forrajes del CIAT.La liberación de los ácidos nucleicos se realizó con una solución de homogenización (3% CTAB, 1.4 M NaCl, EDTA 0.5 M pH 7,5, 1M Tris-HCl pH 7.5, 1% PVP 4000). Luego se realizó la extracción de los ácidos nucleicos con cloroformo: alcohol isoamílico, y la posterior precipitación del DNA con etanol absoluto primero, y posteriormente con etanol 70% (Anexo D).

2.8.2.Cuantificación del ADN.

Para la cuantificación y pureza del ADN extraído de todos los aislamientos se utilizó el espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000/ 2000c Spectrophotometer, Wilmington, Delaware USA.).La medida de la pureza se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, siendo el coeficiente de absorbancia 260/280 el que nos indica la pureza de la solución. Un coeficiente de 1,8 indica que la solución es ADN puro, valores inferiores indican una contaminación por proteínas o polifenoles.Cada muestra de ADN se ajustó a una concentración final de 10 ng/μl y estas diluciones se almacenaron a 4°C para las posteriores pruebas moleculares.

2.8.3.Amplificación parcial de los genes SSU rRNA Bacteriales Por PCR.

Para realizar la amplificación por PCR de la región bacteriana filogenéticamente conservada de los genes 16S rRNA, se utilizaron los cebadores universales para bacterias.

Tabla 1. Caracterización de primers usados por SSCP basados en análisis de comunidades bacterianas.

Primer	Secuencia (5'-3')	Posiciones^a
Com1 forward	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	Bacteria (519 -536)
Com2-Ph Reverse ^b	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	Bacteria (907 -926)

a = Según posición en *E.coli*

b = Com2-Ph contiene un grupo fosfato en el terminal 5'

Siguiendo las condiciones de amplificación sugeridas por (Schwieger & Tebbe, 1998) con algunas modificaciones (20mM de cada dNTP, los primer Com 1 y Com 2Ph 0.2 mM de cada uno y 1 unidad de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega M8295, USA.)) la amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl (Anexo E).

Las amplificaciones se llevaran a cabo en un termociclador (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham 02451, MA, USA) (**Anexo F**). Para la visualización del ADN en geles de agarosa 1.2% se tiñeron con SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen S33102, USA.) tinte altamente sensible para la visualización de ADN en geles de agarosa. Para estimar el tamaño de los productos amplificados se empleó un patrón de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega G2101, USA.) con un rango de lectura entre 1.500 y 100 pb.

2.8.4. Purificación de Productos PCR.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit de Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega A2180, USA) siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial (Anexo G).

2.8.5. Digestión con Exonucleasa Lambda (λ).

Para la digestión de la hebra fosforilada, 10 U de Lambda Exonuclease Reaction Buffer (New England BioLabs® B0262S, Canada) se mezclaron con 10 μ l de producto de PCR resuspendido en un volumen total de 20 μ L conteniendo una concentración final de 1x lambda exonucleasa buffer. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 2 horas (Anexo H). Luego el volumen se incrementó a 100 μ L con agua estéril doblemente destilada y las proteínas fueron extraídas por fenol cloroformo (Orita, Masato; Iwahana, Hiroyuki; Kanazawa, Hiroshi; Hayashi, Kenshi; Sekita, Takao, 1989) (Anexo I).

2.8.6. Perfiles Genéticos por SSCP.

Antes del análisis electroforético se adicionaron 8 μ l del buffer de carga (95% formamida, 10 mM de NaOH, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% cianol xileno) a los productos de PCR tratados con la enzima exonucleasa, y se desnaturizó la mezcla a 94°C por 2 min e inmediatamente se enfrió en hielo después de 1 min, se cargaron las muestras en geles MDE® Gel Solution (lonza Rockland, 50620ME, USA) denaturantes (Anexo J) y se realizó la electroforesis (TBE 1X), en cámara para electroforesis vertical (THERMO SCIENTIFIC® P100DS, Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) (Schwieger & Tebbe, 1998).

2.8.7. Sistema del Gel, Electroforesis y la Tinción.

Se preparó la solución de polimerización del gel de MDE a una concentración de 0,7X y se sirvió, evitando la formación de burbujas (ya que permitiría el paso irregular de la corriente mediante la electroforesis) y se dejó polimerizando por una hora.

A la cámara se le adicionaron 1,5 litros del Buffer TBE 1 X. Se limpió muy bien la superficie del vidrio con muesa, que estará en contacto con la plancha de la cámara. Cualquier impureza o residuo permitirá un paso irregular de la corriente mediante la electroforesis.

Se sembraron las muestras en sus respectivos pozos previamente denaturadas siempre evitando que las muestras se pasen de un pozo a otro. La electroforesis se corrió a 9 mA (mili amperios) por 16 horas, procurando mantener la cámara a 20°C.

Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizó la tinción con plata que mejora la tinción de la banda (Anexo K)(Bassam, et al., 1991)

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

3.1. Análisis Químico de las materias primas.

3.1.1. Materia Seca.

El porcentaje de MS se incrementa con la adición de *Ipomoea* conllevando a una reducción de efluentes y las pérdidas por respiración de los forrajes a ensilar, permitiendo un mayor predominio de bacterias ácido-lácticas y un pH adecuado. La media más alta en las interacciones de edades de corte se presentó en la semana 12, y entre las interacciones de los forrajes la presente *Ipomoea* solo, la MS como controladora de la calidad también afectó los procesos fermentativos dentro de los ensilajes, contenidos de MS inferiores al 23%, ocasionó problemas de contaminación e incremento de las pérdidas del ensilaje, porque se favoreció la actividad bacteriana y se aumentó la producción de ácido butírico, como se muestra en la Tabla 2

Tabla 2. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Materia Seca inicial (Msi)

Edades de corte	Solo			Mezclas			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	33,86 ^{efgh}	--	33,87 ^{efgh}	36,31 ^{de}	--	--	35 ^c
8 semanas	19,7 ^l	42,21 ^c	23,63 ^k	21,5 ^{kl}	33,05 ^{gh}	35,64 ^{efg}	29 ^e
10 semanas	10 ^m	--	38,48 ^d	36,42 ^{de}	--	--	37 ^b
12 semanas	31,12 ^{hi}	35,94 ^{def}	85,8 ^a	56,89 ^b	55,54 ^b	34,34 ^{efg}	50 ^a
16 semanas	--	27,27 ^j	35,39 ^{efg}	--	33,71 ^{efgh}	--	32 ^d
20 semanas	--	31,21 ^{hi}	29,43 ^{ij}	--	33,35 ^{fgh}	--	31 ^d
	² 29,92 ^e	34,16 ^d	42,54 ^a	37,78 ^c	38,91 ^b	34,91 ^d	
	³	34,67 ^b			37,68a		

¹Interacción Entre Edades De Corte.

²Interacción Entre Especies Forrajeras.

³Interacción Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.1.2. Proteína.

En la Tabla 3 se muestran los valores promedios de Proteína Cruda a diferentes edades de corte para todos los tratamientos. Mostrando una disminución con la madurez del forraje y la adición de *Ipomoea*. El mejor resultado fue para los tratamientos sin mezcla, en especial *Vigna* solo.

Tabla 3. Valores de Proteína Cruda para las interacciones: fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas a diferentes edades de corte

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-canavalia	
6 semanas	19,68	--	--	12,22	--	--	15,95
8 semanas	19,40	15,70	6,24	10,72	11,23	15,08	13,06
10 semanas	16,05	--	6,43	9,21	--	--	10,56
12 semanas	13,67	12,72	5,24	7,46	7,27	13,09	9,91
16 semanas	--	8,28	--	--	--	--	8,28
20 semanas	--	12,53	5,22	--	8,24	--	8,66
	² 17,20	12,31	5,78	9,90	8,91	14,09	
	³	11,76		10,97			

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

3.1.3. Fibra Detergente Neutra.

El porcentaje de FDN se incrementó con la madurez del forraje, conllevando a una reducción del contenido de ácidos orgánicos, lo que generó a un descenso en la digestibilidad (DIVMS) y la capacidad buffer (CB). Por consiguiente el mejor porcentaje de FDN lo presentaron los forrajes solos, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Fibra Detergente Neutra FDN.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	38,11 ⁱ	--	--	--	37,09 ⁱ	--	37,6 ^e
8 semanas	37,41 ⁱ	48,17 ^{fgh}	27,89 ^j	44,74 ^h	47,97 ^{fgh}	45,07 ^{gh}	41,9 ^d
10 semanas	13,18 ^k	--	45,03 ^{gh}	52,84 ^{cde}	--	--	51,8 ^b
12 semanas	51,85 ^{def}	58,51 ^b	51,21 ^{def}	54,47 ^{cd}	54,09 ^{cd}	53,37 ^{cd}	53,9 ^a
16 semanas	--	54,56 ^{cd}	49 ^{efg}	--	56,08 ^{bc}	--	53,2 ^{ab}
20 semanas	--	62,74 ^a	27,36 ^j	--	48,19 ^{fgh}	--	46,1 ^c
	² 46,23 ^d	55,99 ^a	40,09 ^e	47,29 ^d	51,58 ^b	49,22 ^c	
	³	43,46 ^b			49,39 ^a		

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.1.4. Fibra Detergente Acida.

La FDA mostró una disminución con adición de *Ipomoea* en las mezclas; efecto producido por los niveles bajos de fibra contenidos en el tubérculo.

La mejor media la presentaron los forrajes solos, en especial *Canavalia*, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas, con respecto a Fibra Detergente Acida FDA.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	28,9 ^{efg}	--	--	17,48 ^{jk}	--	--	23,2 ^c
8 semanas	31,5 ^{efg}	31,8 ^{efg}	7,03 ⁿ	21,34 ^{ij}	26,86 ^{gh}	33,07 ^{ef}	25,3 ^{bc}
10 semanas	57,6 ^a	--	14,82 ^{kl}	28,33 ^{fg}	--	--	27,2 ^{ab}
12 semanas	36,2 ^{ed}	41,4 ^{bc}	12,2 ^m	22,94 ^{hi}	27,78 ^{gh}	36,24 ^{de}	29,5 ^a
16 semanas	--	40,7 ^{cd}	7,3 ⁿ	--	27,28 ^{gh}	--	25,1 ^{bc}
20 semanas	--	45,6 ^b	8,37 ^{mn}	--	22,05 ^{ij}	--	25,3 ^{bc}
	² 33,8 ^b	38,9 ^a	9,95 ^e	22,52 ^d	25,99 ^c	34,65 ^b	
	³	27,98a		26,33 b			

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.1.5. Capacidad Buffer.

La CB mostró una disminución con el estado de maduración de los forrajes y la adición de *Ipomoea*, como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, disminuyendo la utilización de carbohidratos y aumentando la producción de Ácidos Orgánicos.

Tabla 6. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Capacidad Buffer.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	14 ^a	--	--	6,69 ^{ef}	--	--	10 ^a
8 semanas	11,5 ^b	11 ^b	2 ^k	5,02 ^{gh}	7,76 ^{de}	11,47 ^b	8,1 ^b
10 semanas	8,67 ^{cd}	--	1,8 ^k	5,84 ^{fg}	--	--	5,9 ^c
12 semanas	9,05 ^{cd}	10 ^{bc}	2,6 ^{ijk}	3,84 ^{hij}	4,15 ^h	7,61 ^{ed}	6,2 ^c
16 semanas	--	9,1 ^{cd}	4,1 ^{hi}	--	4,76 ^{gh}	--	6 ^c
20 semanas	--	7,6 ^{ed}	2,4 ^{jk}	--	5,21 ^{fgh}	--	5,1 ^d
	² 11,1 ^a	9,5 ^b	2,6 ^d	5,34 ^c	5,47 ^c	9,54 ^b	
	³	7,22a		6,23 b			

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.1.6. Composición química de las especies a ensilar.

En cuanto a la composición química de los Forrajeslos que mostraron buenas características fueron los mezclados con Ipomoea, ya que poseen MS superiores al 35%, PCsuperiores al 7%, FDN < 48%, FDA< 25% y una baja CBcon respecto a los otros tratamientos

Tabla 7. Composición Química-Nutricional (sobre % MS) de los forrajes tropicales (Vigna unguiculata, Canavalia brasiliensis) y batata (Ipomoea batata) y sus mezclas.

Variables	Solo				Mezclas			
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	¹	Vigna- Ipomoea	Canavalia- Ipomoea	Vigna- Canavalia	²
MSi	29,92	34,16	42,54	34,67	37,78	38,91	34,91	37,68
PC	17,2	12,31	5,78	11,76	9,9	8,91	14,09	10,97
FDN	46,23	55,99	40,09	43,46	47,29	51,58	49,22	49,39
FDA	33,78	38,89	9,95	27,98	22,52	25,99	34,65	26,33
CB	11,11	9,46	2,57	7,22	5,34	5,47	9,54	6,23

^{1,2} Interacción Entre Fuentes de Suministro (Solo, Mezcla).

3.2. Calidad de los ensilajes.

a. Sensoriales

3.2.1. Calidad Organoléptica.

Las mejores cualidades según la tabla de calificación de DLG sobre la calidad organoléptica, se lograron con las Mezclas como se muestra en la **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Por lo general todos los tratamientos presentaron características favorables en cuanto al olor y textura, en cuanto al color, algunos tratamientos del ensilado presentaron leves manchas de moho en la parte superficial (ocasionadas por posibles infiltraciones de aire), las cuales no afectaron en sí la calidad del ensilado. En todos los casos los ensilados fueron clasificados como de buena calidad según lo señalado por (DLG, 1997).

Según (Vallejo, 1995) La excelente calidad del ensilaje, de acuerdo a las características organolépticas, se debe a un aporte significativo de carbohidratos solubles y materia seca que son determinantes en la fermentabilidad del ensilaje. Lo cual concuerda con la adición de *Ipomoea*.

Tabla 8. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Calidad Organoléptica.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna-Ipomoea	Canavalia-Ipomoea	Vigna-Canavalia	
6 semanas	19 ^a	--	--	9,7 ^d	--	--	14,3 ^a
8 semanas	11 ^{cd}	12,6 ^{bcd}	13 ^{abcd}	13 ^{abcd}	13 ^{abcd}	17 ^{abc}	13,3 ^a
10 semanas	1,8 ^e	--	19 ^a	13 ^{abcd}	--	--	15,7 ^a
12 semanas	13 ^{abcd}	9,3 ^d	9 ^d	19 ^a	13,6 ^{abcd}	11,3 ^{cd}	12,6 ^a
16 semanas	--	18 ^{ab}	--	--	17 ^{abc}	--	14,9 ^a
20 semanas	--	14,6 ^{abcc}	9,7 ^d	--	13,3 ^{abcd}	--	12,6 ^a
	² 15 ^a	13,67 ^a	12,1 ^a	13,67 ^a	14,25 ^a	14,16 ^a	
	³	12 b			14a		

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

b. Químicos:

3.2.2. Indicador de Acidez pH.

El pH mostró una disminución con adición de *Ipomoea* en las mezclas y la madurez del forraje; efecto producido por los niveles altos de Carbohidratos contenidos en el tubérculo, lo que favoreció la reducción de la respiración evitando así la proteólisis y un hábitat desfavorable para las bacterias indeseables,

Un valor de pH de 4,2 puede ser un buen indicador de la calidad de fermentación para ensilajes de bajo contenido en MS, no siendo adecuado en ensilajes con alto contenido en MS (McDonald, 1982.) Siendo el rango de pH (4,45-5,56) para leguminosas con MS de 25- 40% respectivamente, como se muestra en la **¡Error!**
No se encuentra el origen de la referencia..

Tabla 9. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a pH.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	5,49 ^c	--	--	4,38 ^{ij}	--	--	4,93 ^a
8 semanas	6,04 ^b	5,3 ^{de}	3,63 ^m	4,17 ^k	4,34 ^{ijk}	5,34 ^{cd}	4,8 ^b
10 semanas	9,92 ^a	--	3,98 ^l	4,37 ^{ij}	--	--	4,51 ^{de}
12 semanas	4,61 ^h	5,05 ^f	3,84 ^l	4,59 ^h	4,77 ^g	4,6 ^h	4,58 ^{cd}
16 semanas	--	5,25 ^{de}	4,21 ^{jk}	--	4,45 ^{hi}	--	4,64 ^c
20 semanas	--	5,15 ^{ef}	3,81 ^l	--	4,3 ^{ijk}	--	4,42 ^e
	² 5,33 ^a	5,19 ^b	3,89 ^f	4,37 ^e	4,46 ^d	4,97 ^{cd}	
	³	5,1a			4,53b		

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.2.3. Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total (NH₃-NT).

El NH₃-NT mostró una disminución con la madurez del forraje siendo la semana 12 el que obtuvo valores por debajo del valor óptimo (<7%), como se muestra en la Tabla 10. debido a una reducción de la proteólisis durante el proceso fermentativo. También la adición de *Ipomoea* que conlleva a disminución de microorganismos indeseables responsables de fermentaciones secundarias que degradan proteínas y aminoácidos en N-NH₃.

Tabla 10. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Nitrógeno Amoniacal como porcentaje del Nitrógeno Total NH₃-NT.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	14,94 ^{def}	--	--	21,03 ^{cd}	--	--	18 ^b
8 semanas	27,62 ^c	15,58 ^{def}	47,8 ^a	36,83 ^b	14,38 ^{def}	16,6 ^{de}	26,5 ^a
10 semanas	38,47 ^b	--	8,73 ^{efgh}	8,82 ^{efgh}	--	--	8,74 ^d
12 semanas	5,49 ^{gh}	10,79 ^{efgh}	4,14 ^h	7,74 ^{fgh}	8,67 ^{efgh}	7,83 ^{fgh}	15,7 ^{bc}
16 semanas	--	15,95 ^{de}	16,6 ^{de}	--	14,67 ^{def}	--	7,44 ^d
20 semanas	--	12,89 ^{efg}	14,2 ^{def}	--	11,4 ^{efgh}	--	12,8 ^c
	2						
	14,18 ^b	13,8 ^b	18,3 ^a	18,6 ^a	12,28 ^b	12,21 ^b	
	3						
	17,93 ^a			14,79 ^b			

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.2.4. Ácidos Orgánicos.

3.2.4.1. Acético.

El Ácido Acético mostró una disminución con la adición de *Ipomoea*, siendo *Vigna- Ipomoea* el mejor tratamiento, como se muestra en la Tabla 11.

Según (Muck, 2012) el contenido de ácido acético en ensilajes probablemente se atribuye a que durante la fermentación predominaron las bacterias heterofermentativas, pues el ensilaje al poseer un pH más elevado, fue propicio para este tipo de bacterias, las cuales no hubieran crecido en ensilajes con un pH más ácido.

Tabla 11. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto al Ácido Acético.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semana	0,6 ^{cde}	--	--	0,4 ^{defg}	--	--	0,5 ^c
8 semanas	1,39 ^a	0,69 ^{bcd}	0,5 ^{cdef}	0,63 ^{bcde}	0,63 ^{bcde}	1,16 ^a	0,8 ^a
10 semanas	0,19 ^{gh}	--	0,6 ^{bcde}	0,63 ^{bcde}	--	--	0,7 ^{ab}
12 semanas	0,54 ^{cdef}	1,19 ^a	0 ^h	0,37 ^{efg}	0,51 ^{cdef}	0,57 ^{cdef}	0,5 ^c
16 semanas	--	0,9 ^b	0,4 ^{defg}	--	0,53 ^{cdef}	--	0,6 ^{bc}
20 semanas	--	1,29 ^a	0,3 ^{fg}	--	0,75 ^{bc}	--	0,8 ^a
	² 0,86 ^a 1,02 ^a 0,4 ^{cdef}			0,51 ^{bc} 0,6 ^b 0,87 ^a			
	³ 0,66a			0,62b			

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.2.4.2. Propiónico.

La media más alta de Ácido Propiónico se ve en los ensilajes de forrajes solos, lo que indica que hubo proliferación de las bacterias clostrídicas, principalmente del grupo proteolítico, favoreciendo las mezclas con *Ipomoea* al disminuir los valores de ácido presente, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto al Acido Propiónico.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	0,11 ^{fghi}	--	--	0,08 ^{ghi}	--	--	0,1 ^c
8 semanas	0,3 ^b	0,3 ^b	0,14 ^{fgh}	0,24 ^{bcd}	0,31 ^b	0,22 ^{cde}	0,3 ^a
10 semanas	5,18 ^a	--	0,12 ^{fghi}	0,13 ^{fgh}	--	--	0,2 ^b
12 semanas	0,06 ^{hi}	0,28 ^{bc}	0,04 ⁱ	0,1 ^{fghi}	0,19 ^{def}	0,07 ^{ghi}	0,1 ^{bc}
16 semanas	--	0,15 ^{efg}	0,06 ^{hi}	--	0,1 ^{fghi}	--	0,1 ^c
20 semanas	--	0,14 ^{fgh}	0,11 ^{fghi}	--	0,08 ^{ghi}	--	0,1 ^c
	2 0,16 ^b 0,22 ^a 0,09 ^c			0,14 ^{bcd} 0,17 ^{ab} 0,15 ^b			
	3 0,54a			0,15 b			

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.2.4.3. Ácido Butírico.

El indicador que determinó la calidad fermentativa de los ensilajes, es el ácido butírico, butírico, debido a que este es producido únicamente por el metabolismo de bacterias bacterias indeseables (McDonald, et al., 1991), algunos de los ensilajes estuvieron por por encima del nivel aceptable para la adecuada conservación. No mostrando diferencias diferencias significativas entre los tratamientos. El mejor tratamiento fue *Ipomoea solo*. Como se muestra en la

Tabla 13.

Tabla 13. Efecto entre las interacciones: Estado de madurez, Fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Acido Butírico.

Edades de corte	solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semana	0,17	--	--	0,47	--	--	0,3
8 semanas	0,71	0,02	0,89	0,82	0,11	0,12	0,3
10 semanas	0,89	--	0	0,24	--	--	0,1
12 semanas	1,36	0,04	0	0,12	0,007	0,13	0,3
16 semanas	--	0,09	0,03	--	0,01	--	0
20 semanas	--	1,58	0	--	0,56	--	0,7
	² 0,59	0,43	0,02	0,41	0,14	0,12	
	³	0,39			0,3		

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

3.2.5. Análisis de la calidad de los ensilajes

En cuanto a la calidad fermentativa de los ensilajes los que mostraron mejores características fueron las mezclas con Ipomoea, ya que posee, un pH entre 4,5 – 5.6, Ácido Acético menor 1.8%, Acido Propiónico cercanos a 1% y un contenido de ácido Butírico menor al 0,1% con respecto a los otros tratamientos. En cuanto a NH3-NT el porcentaje mínimo que debe tener un ensilaje con excelentes características en valores menores del 7% lo que indica que hubo degradación de proteínas debido al pH alto que se maneja en leguminosas.

Tabla 14 . Composición Química Nutricional (sobre % MS) de los forrajes tropicales (Vigna unguiculata, Canavalia brasiliensis) y batata (Ipomoea batata) y sus mezclas.

Variables	Solo				Mezclas			
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	¹	Vigna-Ipomoea	Canavalia-Ipomoea	Vigna-Canavalia	²
<u>sensoriales</u>								
Color								
Olor	14,58	13,57	12,06	12	13,67	14,25	14,16	14
Textura								
<u>Químicas</u>								
pH	5,33	5,19	3,89	5,1	4,37	4,46	4,97	4,53
NH3-NT	14,18	13,8	18,28	17,93	18,6	12,28	12,21	14,79
Acido Acetico	0,86	1,02	0,37	0,66	0,51	0,6	0,87	0,89
Acido Propionico	0,16	0,22	0,09	0,54	0,14	0,17	0,15	0,15
Acido Butirico	0,59	0,43	0,02	0,39	0,41	0,14	0,12	0,3

^{1,2} Interacción Entre Formas de Suministro (Solo, Mezcla).

3.3. Análisisquímico de los ensilajes:

3.3.1. Materia Seca Corregida.

La adición de *Ipomoeamejoro* la MS

Tabla 15. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Materia Seca Corregida por perdidas de ácidos grasos.

Edades de corte	Solo			Mezcla			
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semana	35,1 ^{efg}	--	--	37,48 ^{de}	--	--	36,29 ^c
8 semanas	21,3 ^k	43,23 ^c	25,12 ⁱ	23,04 ^{jk}	34,3 ^{fg}	36,83 ^{ef}	30,63 ^e
10 semanas	35 ^{efg}	--	39,59 ^d	37,59 ^{de}	--	--	37,8 ^b
12 semanas	32,4 ^{gh}	37,12 ^{edf}	85,72 ^a	57,55 ^b	56,23 ^b	35,56 ^{ef}	50,77 ^a
16 semanas	--	28,67 ⁱ	36,59 ^{ef}	--	34,95 ^{efg}	--	33,4 ^d
20 semanas	--	32,51 ^{gh}	30,78 ^{hi}	--	34,59 ^{fg}	--	32,63 ^d
	31,3 ^e	35,38 ^d	43,56 ^a	38,91 ^c	40,02 ^b	36,19 ^d	
		37,17 ^b			38,82 ^a		

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Formas de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.3.2. Cenizas.

De acuerdo con la adición de *Ipomoea* y la Madurez del forraje, se disminuyó el contenido de Cenizas, lo que generó un aumento en la cantidad de Materia Orgánica, la mejor interacción de los forrajes la presentaron los forrajes mezclados como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a Cenizas.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	17,35 ^b	--	--	11,89 ^d	--	--	15 ^a
8 semanas	15,44 ^c	15,58 ^c	6,66 ^g	9,13 ^f	12,08 ^d	14,96 ^c	12 ^b
10 semanas	36,36 ^a	--	4,02 ^h	9,79 ^{ef}	--	--	10 ^c
12 semanas	11,07 ^{ed}	11,52 ^d	4,86 ^h	6,76 ^g	8,2 ^{fg}	11,05 ^{ed}	9 ^d
16 semanas	--	11,24 ^{de}	5,03 ^h	--	7,46 ^g	--	8 ^e
20 semanas	--	11,16 ^{ed}	4,38 ^h	--	7 ^g	--	8 ^e
	² 14,26 ^a	12,37 ^b	4,99 ^d	9,39 ^c	8,7 ^c	13 ^b	
		³ 11,9 ^a			9,85 ^b		

¹Interacción Entre Edades De Corte.

²Interacción Entre Especies Forrajeras.

³Interacción Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.3.3. Digestibilidad de los ensilajes.

La mayor digestibilidad *in vitro* de los ensilajes fue para *Ipomoea* solo, teniendo en cuenta que la batata (*Ipomoea batata*) posee mayor contenido de carbohidratos hidrosolubles y menos lignina, con respecto a los forrajes. Por lo anterior la mayor digestibilidad se presentó en las mezclas con *Ipomoea*.

La DIVMS se vio disminuida al aumentar la madurez de los forrajes. Como se muestra en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 17. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a la DIVMS.

Edades de corte	Solo			Mezcla			1
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna- <i>Ipomoea</i>	Canavalia- <i>Ipomoea</i>	Vigna-Canavalia	
6 semanas	51,8 ^{gh}	--	--	65,58 ^{ed}	--	--	58,67 ^a
8 semanas	42,5 ^{ij}	42,6 ^{ij}	72,4 ^{bc}	60,22 ^{ef}	51,87 ^{gh}	40,64 ^{ij}	51,7 ^b
10 semanas	88,4 ^a	--	67,2 ^{cd}	49,63 ^{gh}	--	--	51 ^b
12 semanas	38,9 ^{jk}	27,8 ^l	75,5 ^b	68,18 ^{cd}	54,9 ^{fg}	37,18 ^{jk}	50,41 ^b
16 semanas	--	34,1 ^k	69 ^{cd}	--	47 ^{hi}	--	50,02 ^b
20 semanas	--	27,6 ^l	85,5 ^a	--	54,22 ^{fg}	--	55,77 ^a
	² 42,4 ^d	33 ^f	73,9 ^a	60,9 ^b	52 ^c	38,91 ^e	
		³ 55,63 ^a			52,95 ^b		

¹Interaccion Entre Edades De Corte.

²Interaccion Entre Especies Forrajeras.

³Interaccion Entre Fuentes de Suministro.

Datos con letras diferentes, indican diferencias significativas, según la prueba de Duncan (P<0,05)

3.3.4. Composición Nutricional de los ensilajes.

En cuanto a la composición nutricional de los ensilajes mostraron mejores características las mezclas con Ipomoea, ya que posee, un pH entre 4,5 – 5.0, un contenido de cenizas y de NH₃-NT alrededor del 10%, Ácido Acético menor 2%, Acido Propiónico cercanos a 1% y un contenido de ácido Butírico menor al 0,1% con respecto a los otros tratamientos. Como se muestra en la Tabla 18

Tabla 18. Composición Química Nutricional (sobre % MS) de los forrajes tropicales (Vigna unguiculata, Canavalia brasiliensis) y batata (Ipomoea batata) y sus mezclas

Variables	Solo				Mezclas			
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	¹	Vigna-Ipomoea	Canavalia-Ipomoea	Vigna-Canavalia	²
Mscorr	31,26	35,38	12,06	37,2	38,91	40,02	36,19	38,82
Cenizas	14,26	12,37	4,99	11,9	9,39	8,7	13	9,85
DIVMS	42,38	33,02	73,91	55,6	60,9	52	38,91	52,95
FDA*	33,78	38,89	9,95	28	22,52	25,99	34,65	26,33

^{1,2} Interacción Entre Formas de Suministro (Solo, Mezcla).

*materias primas sin ensilar (r = -0.93) con DIVMS

3.4. Caracterización molecular de BAL en los ensilajes.

La inclusión de una fuente de carbohidratos solubles como lo es el tubérculo de *Ipomoea* mejoró notablemente las concentraciones de bacterias, lo cual conlleva a acelerar el proceso fermentativo, incrementándose, así la producción de ácidos grasos volátiles, y mejorando la cálida de los ensilajes. Como se muestra en la Tabla .

Tabla 19. Efecto entre las interacciones: estado de madurez, fuentes de suministro y forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas con respecto a número de Bacterias.

Edades de corte	Solo			Mezcla		
	Vigna	Canavalia	Ipomoea	Vigna-Ipomoea	Canavalia-Ipomoea	Vigna-Canavalia
6 semanas	+ ^{bdghi}
8 semanas	+ ^{dghij}	++ ^{fgijlo}	+++ ^{bcdfglop}	..	++ ^{fgijl}	..
10 semanas	+ ^{dfghilm}	+++ ^{bcdfghimnop}
12 semanas	+ ^{defghijlm}	..	+++ ^{abcdefgl}	+++ ^{bcdfghmnop}	++ ^{fgijlo}	+ ^{fghil}
16 semanas	+++ ^{bcdefgjklop}	..	++ ^{fgijl}	..
20 semanas	++ ^{cfgij}	..

+ 0 - 6 bacterias

++ 6- 8 bacterias

+++ 8-12 bacterias

a. *Rhizobium trifolii*

c. *Flavobacterium johnsoniae*.

d. *Lactobacillus brevis*.

e. *Bulkholderia glumae*.

f. *Lactobacillus plantarum*

j. *Agrobacterium tumefaciens*.

3.4.1.Extracción de ADN y Amplificación de los genes 16S.

El procedimiento utilizando CTAB para la extracción de ADN total, mostró buena cantidad y alto peso molecular con buena pureza, libre de inhibidores o contaminantes (Figura 1), los productos amplificados con los primers universales Com1 (Forward) y Com2-Ph (Reverse) amplificando la región 16S rDNA gen bacteriano presente en todos los organismos procariotas tuvieron un peso molecular entre 300 a 400 bp(Figura 2).

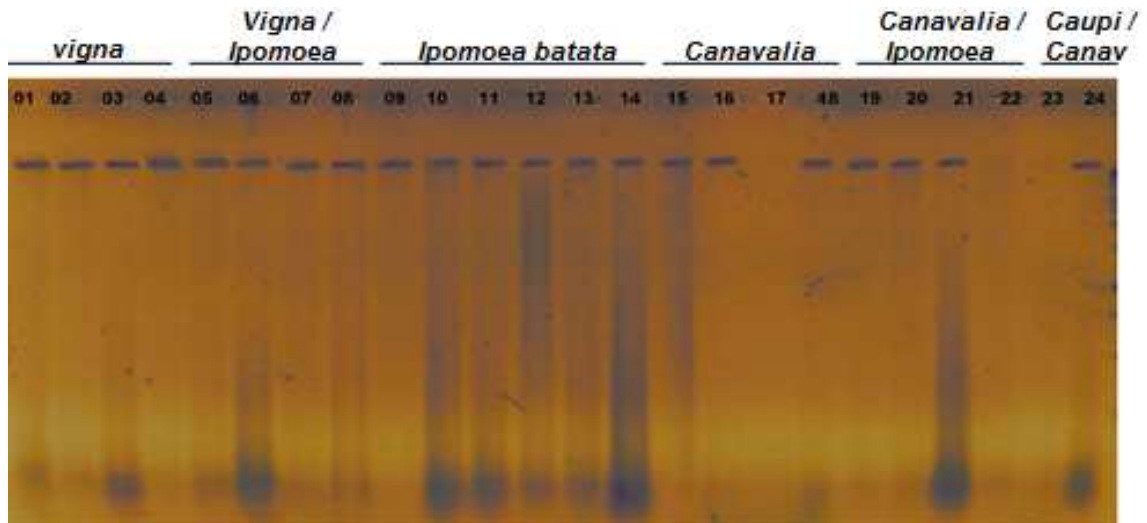


Figura 1. Extracción de ADN total de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* *Ipomoea batata* y sus mezclas, con diferente edad de corte. Utilizando Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB).

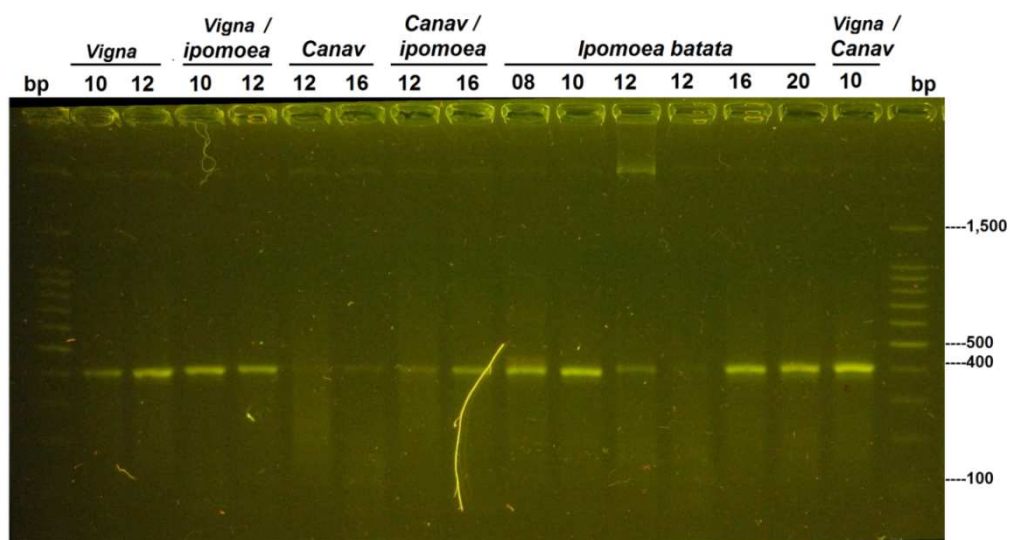


Figura 2. Amplificación de la región 16S rDNA de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, utilizando los primers universales com1 y com 2-Ph* (*contiene un grupo fosfato en el terminal 5').

3.4.2. Análisis Por SSCP.

En los análisis por SSCP, los primers Com1 y Com 2Ph, diseñados para amplificar la región de los genes 16S rDNA de las eubacterias, identificando un total de 17 bandas sencillas de ADN diferente, mostrando variaciones en la estructura de las comunidades bacterianas en geles de MDE. Las mezclas de las leguminosas con batata (1:1) mostraron mayor número de bandas, lo que representa una amplia variedad de bacterias. El factor edad de corte también afectó la cantidad de bandas. En las líneas 1, 13 y 25, el marcador de comunidad compuesto por 6 bandas: (*Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Burkholderia glumae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Agrobacterium tumefaciens*.) (Figura 3). Electroforéticamente *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum* tienen la misma conformación en geles de SSCP.

Las bacterias más comunes en los tratamientos fueron: Posición g.bacteria desconocida, se encontró en 15 de los 24 tratamientos (Figura 4); demostrando

ser la especie dominante en todos los perfiles de SSCP, independientes del ensilado o la edad de corte, lo que sugiere que las bacterias que pertenecen a esta banda puede adaptarse a diferentes condiciones. Otros signos, como la posición f. (*Lactobacillus plantarum*) se encontró en 13 de los 24 tratamientos y la posición d. (*L. brevis*) se encontró en 9 de 24 tratamientos, estas bacterias parecen ocurrir en la mayoría pero no en todos los perfiles, independientes de la edad de corte y la mezcla, y otros signos como en la posición j. (*Agrobacterium tumefaciens*) se encontró en 7 de los 24 tratamientos. En la posición. c. (*Flavobacterium johnsoniae*) ocurrió en 6 de los 24 tratamientos.

Basados en los resultados de identificación de grupo de análisis, estos perfiles mostraron una similitud de 54.1% entre las Formas de Suministro y las Edades de Corte.

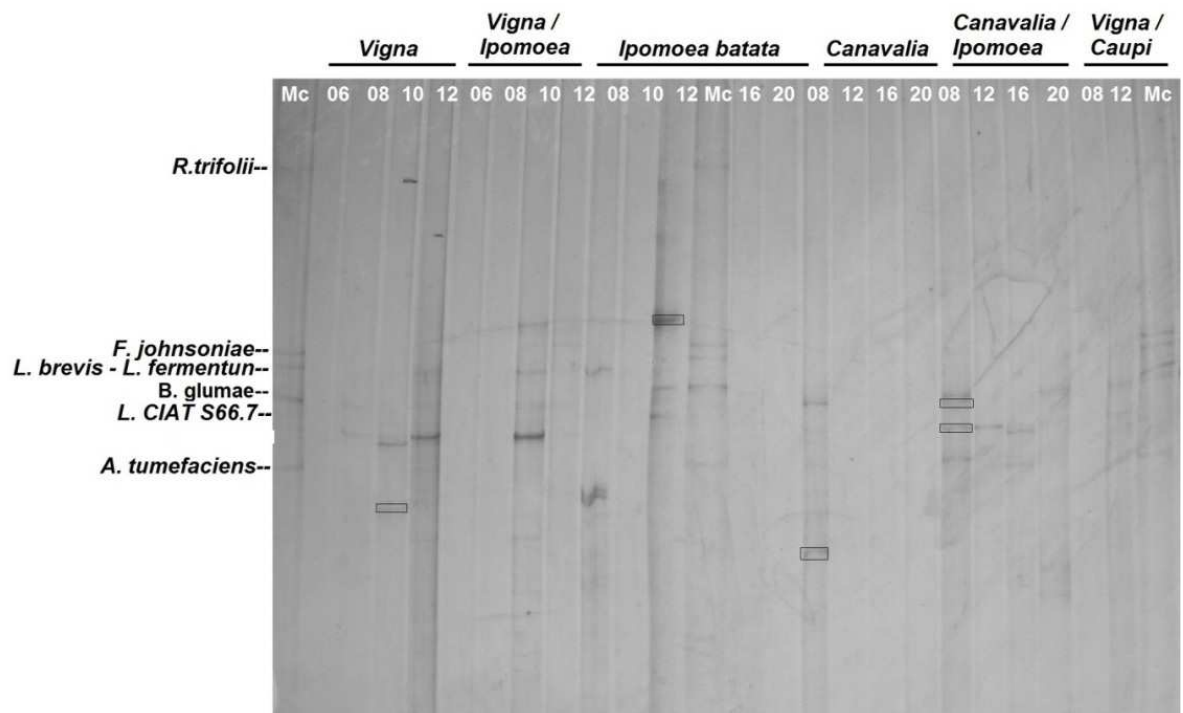


Figura 3. Perfiles SSCP producidos por amplificación de PCR del gen 16S rDNA de muestras de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, con diferentes edades de corte. En la línea 1,13 y 25 marcador de comunidad compuesto por: *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Burkholderia glumae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Estos perfiles revelan 3 grupos que se encuentran influenciados por la especie (*Canavalia*, *Ipomoea* y *Vigna*); el grupo I, se encuentra influenciado por los tratamientos con *Ipomoea batata*, el grupo II se encuentra influenciado por los tratamientos con *Canavalia* y su mezcla con *Ipomoea* y el grupo III influenciado por *Vigna* y sus mezclas, como se muestra en la Figura 4.

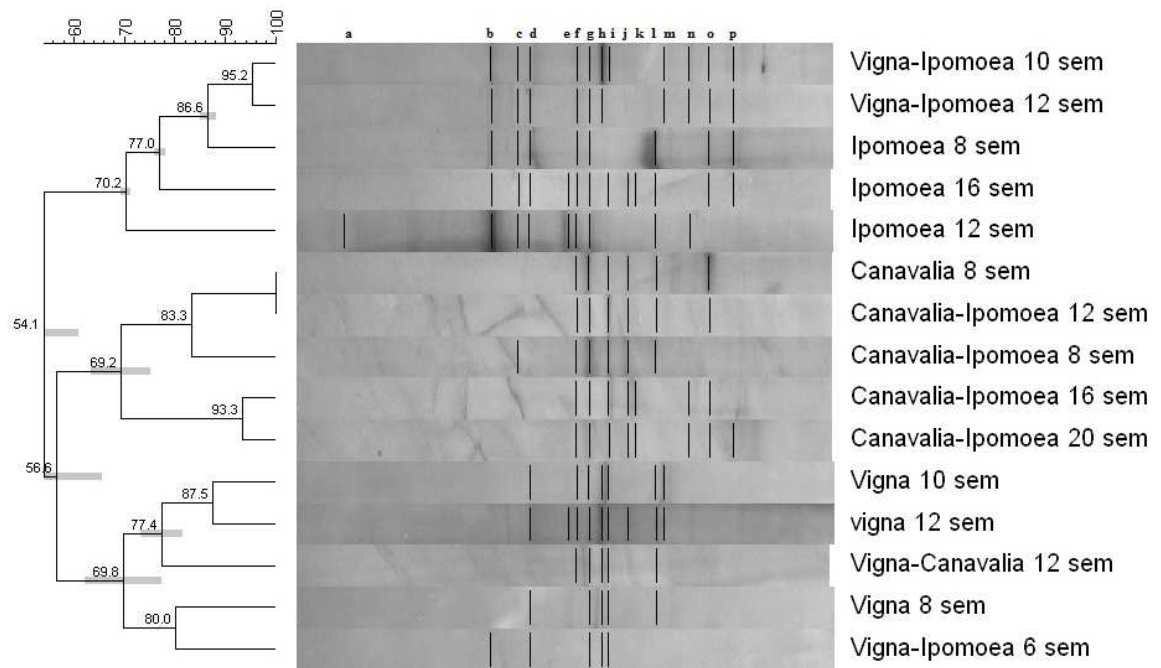


Figura 4. Análisis de similaridad de perfiles de SSCP producidos por amplificación de PCR del gen 16S rDNA de muestras de ensilajes de forrajes tropicales *Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis* e *Ipomoea batata* y sus mezclas, con diferentes edades de corte como se muestra en la figura 3. Usando GelCompar II. Marcador de comunidad en las posiciones f. (*Lactobacillus plantarum*), d. (*Lactobacillus brevis*), j. (*Agrobacterium tumefaciens*), c. (*Flavobacterium johnsoniae*), e. (*Bulkholderia glumae*) y a. (*Rhizobium trifolii*).

En las técnicas de SSCP o DGGE- TGGE usadas para análisis de comunidad microbiana, el tamaño de los productos disponibles de perfiles genéticos (longitud máxima de cerca de 500 bp) puede limitar la precisión de la identificación de las especies, pero podría no ser crucial para una evaluación comparativa de las estructuras de la comunidad microbiana en las muestras (Smalla, et al., 2007)

Los perfiles genéticos generados de SSCP consistieron en 17 productos distinguibles (longitud máxima de 450 pb) con diferente intensidad, lo que reflejó la riqueza y abundancia de bacterias dentro de los ensilajes, estos productos fueron diferentes en movilidad electroforética, probablemente debido a diferentes secuencias, causando diferentes conformaciones bajo condiciones no denaturantes. Sin embargo, existe la posibilidad de que productos únicos podrían haber adquirido más de una conformación, bajo tales condiciones(Orita, Masato; Iwahana, Hiroyuki; Kanazawa, Hiroshi; Hayashi, Kenshi; Sekita, Takao, 1989)(Dohrmann & Tebbe, 2004).

Uno de los principales inconvenientes de esta técnica, es que no se han podido determinar con precisión los efectos de algunos parámetros que afectan la sensibilidad del análisis de SSCP, como por ejemplo: la composición del gel, el tamaño del fragmento de ADN, la composición del tampón, los aditivos como el glicerol, la concentración de ADN y el contenido de guanina/citosina (G+C) del ADN. Por otro lado se ha señalado que fragmentos mayores de 200 nucleótidos son menos sensibles a ser detectados por SSCP (Sheffield, et al., 1993), sin embargo, el presente trabajo ha demostrado que en condiciones adecuadas alelos entre 350 y 400 pares de bases pueden ser detectados.

4. CONCLUSIONES.

4.1. Análisis químico de las materias primas.

Los rangos para evaluar un forraje para ser ensilado con buenas características son las siguientes: MS mayor de 35%, , PC mayor de 7%, Cenizas menor del 10%, FDN menor de 50% y FDA menor de 25%. Manteniendo estos valores disminuyen las pérdidas por efluentes, pH disminuye rápidamente evitando degradación de proteínas, consumo y la digestibilidad no se ven afectados.

4.2. Calidad de los ensilajes

Se puede afirmar que la inclusión de *Ipomoea batata* mejoro la calidad de los forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*), principalmente por el aporte de carbohidratos solubles lo que favoreció un aumento en la población bacteriana, descenso del pH y unas buenas características organolépticas.

en forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas, el momento óptimo de corte fue entre las 10 y las 12 semanas cuando se presenta una mejor tendencia hacia los parámetros de importancia relacionados con la calidad en los ensilados, como lo son bajo pH, baja CB y menor cantidad de nitrógeno amoniacal.

4.3. Valor nutricional de los ensilajes.

El valor nutritivo de los ensilajes y la digestibilidad de los mismos, estaba ligado directamente con la calidad de conservación, que viene definida por los productos finales de las fermentaciones (NH₃-NTy ácidos orgánicos), estos parámetros aportaron información sobre el proceso fermentativo que tuvo lugar en los ensilajes

delos forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas.

4.4. Caracterización molecular

Este estudio demostró la aplicabilidad y factibilidad de la técnica de PCR-SSCP para evaluar la diversidad de bacterias encontradas en ensilajes de forrajes tropicales (*Vigna unguiculata*, *Canavalia brasiliensis*) y batata (*Ipomoea batata*) y sus mezclas diferentes edades de corte, también demostró ser una herramienta útil para estudiar los factores que afectan el ensilado, aparte de controlar la presencia o ausencia de miembros de la población en estudio.

La técnica de SSCP para caracterizar las comunidades bacterianas utilizando primers universales demostró, que los ensilajes con mezcla de *Ipomoea batata*, presentaron las mejores características sensoriales y los valores más bajos de pH, lo mismo que una alta variedad de bacterias y una buena calidad del ensilaje.

Es importante mencionar que los productos comerciales de bacterias, incluyen una o más de las siguientes especies: *Lactobacillus plantarum* otras especies de *Lactobacillus*, especies diversas *Pediococcus*, y *Enterococcus faecium*. Bacterias Homofermentadores [estas producen más del 85% del ácido láctico a partir de hexosas (azúcares C₆) como la glucosa pero no pueden degradar las pentosas (azúcares C₅) como la Xilosa]. Comercialmente no distribuyen inóculos específicos para ser utilizados en los silos de leguminosas y forrajes tropicales, en los que los carbohidratos solubles predominantes son las pentosas. Esta investigación pretende poner a disposición de los productores, posibles alternativas de inóculos para ensilar forrajes que normalmente son difíciles de ensilar como son las leguminosas y forrajes tropicales.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta , E. S; Ribera, R.; Botero , R.; Taylor, R.;; 2005. Evaluacion de tres raciones alternativas para la sustitucion del concentrado comercial en el engorde de cerdos. *Tierra Tropical*, 2(2), pp. 97-104.

ACP, 2009. Costos de produccion para diferentes etapas de explotaciones porcícolas. *Revista Porcicultura Colombiana*, junio. Volume 130.

ACP, 2011. *asociacion Colombiana de Porcicultura*. [En línea] Available at: <http://www.porcicol.org.co>[Último acceso: 26 enero 2012].

AOAC, 1990. Official Methods of Analysisi of the Association of Official Analytical Chemists. 15(942.05).

Bassam, B. J., Anolles, G. C. & Gresshoff, P. M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels Br. july, 196(1), pp. 80-83.

Betancourt, M., González, I. & Martínez , M., 2005. Evaluación de la calidad de los ensilajes. *Revista Digital CENIAP* , Issue 8.

Bindelle, j., Buldgen, A. ., Boudry, C. & Leterme, P., 2007. Effect of inoculum and pepsin–pancreatin hydrolysis on fibre fermentation measured by the gas production technique in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, Volumen 132, p. 111–122.

Boisen, S. & Fernandez, J. A., 1997. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro alalyses. *Animal Feed Science Technology*, Volumen 68, pp. 277-286.

Bolsen, K. . K. & Brent, B. E., 2007. *The Silage Triangle and Important Practices Often Overlooked*. Kansas State University, Courtesy of Alltech Inc.

Buxade, Carlos M., 1994. *Zootecnia, Bases de Produccion Animal*. España.

Cañete, M. V. ; Sacha, J. L., 1998. *Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes*. ISBN: 9788471147301 ed. España: Mundi-Prensa Libro, S.A.

Caravaca, F. P.; Castel, J. M.; Guzman, J. L.; Delgado, M.; Mena, Y.; Alcalde, M. J.; Gonzalez, P., 2003. *Bases De La Produccion Animal*. Sevilla: Los Autores.

Carvajal, J. I., 2010. *Digestibilidad In Vitro Prececal Y Cecal De Plantas Forrajeras Tropicales Para La Nutrición En Cerdos*. Palmira Valle: Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

Castro, G., 2013. *Valor nutricional del grano de caupì (vigna unguiculata) para cerdos en crecimiento*. Maestría thesis ed. Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Chaverra, G. & Bernal, E., 2000. *Ensilaje en la alimentación de ganado vacuno*. Bogotá, Colombia.: IICA. Tercer Mundo Editores.

Cheng, H.-R. & Jiang, N., 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *biotechnology Letters*, Volumen 28, pp. 55-59.

Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M. and Schultze-Kraft, R., 2005. *Tropical Forages: an interactive selection tool.*, [CD-ROM], Brisbane, Australia: CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI.

Cussen, Robert; Neira, Lya, 1998. *Inoculantes bacterianos como aditivos para ensilaje: Seminario Internaciona Conservacion de Forrajes de Alta Calidad*. Quilamapu, Chillan, pp. 12-33.

De la Roza, B., 2005. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. *IV Jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade*, pp. 1-20.

DLG, 1997. *key to assessing the quality of fermentation of forage silages on the basis of chemical analysis (according to Weissbach and Honig) Part B, version 1.8*. German, Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft.

DLG, 2006. *Schlüssel zur Beurteilung der Gärqualität von Grünfuttersilagen auf Basis der chemischen Untersuchung..* German, Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, pp. 2-4.

Dohrmann, A. B. & Tebbe, C. C., 2004. *Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)*. Germany: Molecular Microbial Ecology Manual.

Dung, N., Manh, L. & Uden, P., 2002. Tropical fibre sources for pigs-digestibility, digesta retention and estimation of fibre digestibility in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, Volumen 102, pp. 109-124.

Ehle, F. R., Jeraci, J. L., Robertson, J. B. & Van Soest, P. J., 1982. The Influence of Dietary Fiber on Digestibility, Rate of Passage and Gastrointestinal Fermentation in Pigs. Volumen 55, pp. 1071-1081.

Ehrmann, M. A. & Vogel, R. F., 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, Volumen 16, p. 31–42.

Elferink, S. J. W., Driehuis, F., Gottschal, J. C. & Spoelstra, S., 1999. *Silage fermentation processes and their manipulation*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/gricult/agp/agpc/gp/silage/contents>.

FENALCE, 2011. *Caracterización del cultivo de maíz en Colombia*. [En línea] Available at: <http://www.fenalce.org>[Último acceso: 26 Enero 2012].

Goering, H. K. & Van Soest, P. J., 1970. Forage fiber analysis, ARS, USDA,.

Gorosito, R., 1997. *Cantidad, calidad y tamaño de la fibra en la dieta de vacas lecheras*. [En línea] Available at: www.produccion-animal.com.ar

Heinritz, S. N.; Hoedtke, S.; Martens, S. D.; Peters, M.; Zeyner, A., 2012. *Evaluation of ten tropical legume forages for their potential as pig feed supplement. Livestock Research for Rural Development*. [En línea] Available at: <http://www.lrrd.org/lrrd24/1/hein24007.htm>[Último acceso: 26 agosto 2012].

Heuzé, v., Tran, G. & Hassoun, P., 2012. *Sweet potato (Ipomoea batatas) forage. Feedipedia.org a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO*. [En línea] Available at: <http://www.feedipedia.org/node/551>[Último acceso: 12 Junio 2013].

James, E. M., Bathe, S., Clapp, J. P. & Burns, R. G., 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology*, Volumen 36, pp. 139-151.

Jaster, E., 1995. Legume and grass silage preservation. In: Post-harvest physiology and preservation of forages. *CSSA Special Publications*, Volumen 22, pp. 91-115.

Jobim, C. C., Nussio, L., Reis, R. & Schmidt, P., 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem canservada. *Revista brasileira de zootecnia*, 36(suplemento especial), pp. 101-119.

Keles, G. & Demirci, U., 2011. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale-Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*, Volumen 164, pp. 21-28.

Leterme, P. & Estrada, F., 2008. *Análisis de los alimentos y forrajes destinados a los animales. Notas de Laboratorio*, Palmira Valle del Cauca: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Lyhs, U., 2002. *Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish*. Helsinki, Finland, Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki.

MacDonald, P., Henderson, A. R. & MacGregor, A. W., 1968. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19(3), pp. 125-132.

Machin, D., H., 1999. *Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Smallholders*. Roma, Proceedings of the FAO Electronic Conference on Tropical Silage, pp. 73-81.

Makkar, H., 2004. *Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources*. Roma, FAO, pp. 55-88.

McDonald, P., 1982.. The effect of conservation processes on the nitrogenous components of forages. Occasional Publication. *British Society of Animal*, p. Production 41–49.

McDonald, P. & Henderson, A. R., 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage.. *Journal Science Food Agric*, pp. 13-395.

McDonald, . P., Henderson, N. & Heron, S., 1991. The Biochemistry of Silage. *Chalcombe Publications*.

Ministerio de Agricultura, 2012. *Perspectivas Agropecuarias primer semestre de 2011*. [En línea]Available at: www.minagricultura.gov.co [Último acceso: 27 agosto 2012].

Montoya, C. A. & Leterme, P., 2011. Effect of particle size on the digestible energy content of field pea (*Pisum sativum* L.) in growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 169(1-2), p. 113–120.

Muck, R., 2012. *Microbiology of ensiling*. finland, MTT Agrifood Research Finland University of Helsinki, pp. 76-86.

Muck, R. E., 1988. Factors Influencing Silage Quality and Their Implications for Management. *Journal of Dairy Science*, 71(11), pp. 2992-3002.

Nguyen Nhut, X. D., Luu Huu , M. & Peter, . U., 2002. Tropical fibre sources for pig – digestibility, digesta retención and estimation od fibre digestibility in vitro. *Animal feed Science and technology*, Volumen 102, pp. 109-124.

Ojeda, F., Caceres, O. & Esperance, M., 1991. *Estudio 8. Conservación de Forrajes*. Roma, Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre, p. 80.

Orita, Masato; Iwahana, Hiroyuki; Kanazawa, Hiroshi; Hayashi, Kenshi; Sekita, Takao, 1989. Detection of Polimorphisms of human DNA by gel electrophoresis as Single-Strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, pp. 2766-2770.

Ortega, Einar Artiles ; Hoek, Rein Van Der; Orozco, Raciél Lima ; Rodríguez, Carlos ; Hoedtke, Sandra ; Sarria, Patricia ; Martens, Siriwan, 2012. *Performance of pigs fed with fresh and ensiled forage of Vigna unguiculata CIAT 4555, Lablab purpureus CIAT 22759 and Cajanus cajan*. Finland, XVIth International Silage Conference, pp. 170-171.

Pang, H.; Zhang, M.; Qin, G.; Tan, Z; Li, Z; Wang, Y.; Cai, Y., 2011. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers.. *Animal Science Journal*, 82(5), p. 642–653.

Peters, M; Franco, L. H.; Schmdit, A. e Hincapie, B, 2011.. *Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores del trópico americano.*, Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ);Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ).

Peters, S., Koschinsky, S., Schwienger, F. & Tebbe, C. C., 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 930-936.

Phuc, B. N. & Lindberg, J. E., 2000. Ileal and total tract digestibility in growing pigs given cassava root meal diets with inclusion of cassava leaves, leucaena leaves and groundnut foliage. *animal scientific*, Volumen 71, pp. 301-308.

Porebski, S. L., Bailey, G. & Baum, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), pp. 8-15.

Ravindran, V. & Brair, R., 1992. Feeds resources for poultry production in Asia and the Pacific region. II. Plant protein sources.. *World's Poultry Sci. J.* , Volumen 48, p. 205–231.

Ravindran, . V., Kornegay, E. T., Rajarugu, A. S. & Notter, S. B., 1987. Cassava leaf meal as a replacement for coconut oil meal in pig diets. *J. Sci. Food Agr.*, Volumen 41, pp. 45-53.

Samaniego , L. M. & Sosa del Castillo, M., 1998. *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora.*, Matanzas, Cuba.

Sanabria, A. M., Abello, J. F. & Martens, S. D., 2009. *Protocol Standardization for Total DNA Extraction of Tropical Silages Preparing 16S rRNA Analysis for Microbial Community Characterization*, Cali, Colombia: International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

Sandoval, R. A., Nielsen, T. K. & Sorensen, P. H., 1987. Effects of Fibre on Nutrient Digestion and Time of Passage in Growing Pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*, Volumen 37, pp. 367-373.

Santoyo, G., 2008. Recombinería en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Enero - Marzo., Volumen 50, pp. 38-47.

Sarria , P.; Montoya, C.; Yusti, L. M.; Orejuela, I.; Guevara, M.; Cruz, A. C.; Arredondo , J.; Londoño, A.; Peters, M., 2010. *Valor nutricional de la harina de hoja de caupí (Vigna unguiculata (l) walp.) en cerdos en crecimiento..* [En línea] Available at: <http://www.lrrd.org/lrrd22/6/sarr22110.htm>[Último acceso: 26 Agosto 2012].

Schmalenberger, A. y otros, 2008. Two-dimensional single strand conformation polymorphism (SSCP) of 16S rRNA gene fragments reveals highly dissimilar bacterial communities in acidic fen. *Journal of Soil Biology*, pp. 495-500.

Schwieger, F. & Tebbe, C. C., 1998. A new approach to utilize PCR-Single-Strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-base microbial community analysis. *Applied and Enviromental Microbiology*, pp. 4870-4876.

Sheffield, V. et al., 1993. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitutions. *Genomics.*, Volume 16, pp. 325-332.

Siegfried, R., Rückemann, H. & Stumpf, G., 1984. An HPLC method for determining organic acids in silage.. *Landwirt. Forsch*, Volumen 37, p. 298–304..

Siriwan, Martens; Avila, Patrica; Gil, Jorge L; Franco, Luis H; Peters, michael, 2008. *Silaje Quanlity of the legumes Vigna Unguiculata and Canavalia Brasilienseis solely and with Sweet Potato Root as an alternative Pig Feedong*, Cali Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.

Smalla, K. y otros, 2007. Bacterial diversity of soils assessed By DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?. *journal of Microbiological Methods*, pp. 470-479.

Tobia, C. R. & Vargas, E. G., 2000. Inoculos bacterianos para mejorar el proceso fermentativo en los ensilajes tropicales. *Nutricion Animal Tropical*, Volumen 6, pp. 129-143.

Tobía, C., Uribe, L. & Villalob, E., 2003. Aislamiento, seleccion y caracterizacion de bacterias acido lacticas en ensilajes de soya. *Agronomía Costarricense*, 27(2), pp. 21-27..

Vallejo, M. A., 1995. *Efecto del premarchitado y la adición de melaza sobre la calidad del ensilaje de diferentes follajes de arboles y arbustos tropicales*. Turrialba.

Van Soest, P. J., 1964. New Chemical Procedures for Evaluating Forages, Symposium on Nutrition and Forage and Pastures:. *Journa Animal Science*, 23(3), pp. 838-845.

Van Soest, P. J., 1978. Dietary fibre: Their definition and nutritional properties.. *American Journal of clinical nutrition*, Volumen 31, pp. 512-520.

Voigt, J. & Steger, H., 1967. Zur quantitativen Bestimmung von Ammoniak, Harnstoff und Ketokörpern in biologischem Material mit Hilfe eines modifizierten Mikrodiffusionsgefäßes. *Archiv Tierernähr*, p. 17:289.

Weissbach, F. & Kuhla, S., 1995. *Substance losses in determining the dry matter content of silage and green fodder: Arising errors and possibilities of correction*. Übersicht: Tierernährung.

Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A. C. & Verhoef, J., 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3002-3007.

Wilkinson, J. M. & Davies, D. R., 2012. The aerobic stability of silage. *XVI International silage Conference*, 2-4 July. pp. 68-69.

ANEXOS

Anexo A. Description of the DLG-key

<u>Sensory evaluation of silages</u>	
<u>Description of the DLG-key (German Agricultural Association)</u>	
1. Smell	Points
a) free of butyric acid smell, pleasant sourish, aromatic, fruitlike, also distinct breadlike	14
b) weak or only in traces existing butyric acid smell (finger test) or strongly sour, acrid, little aromatic or weak, but pleasant roast smell if pre-wilted silage	8
c) moderate butyric acid smell or distinct, often acrid roast smell or musty	4
d) strong butyric acid smell or ammonia smell or stale, only very weak acid smell	2
e) faecal smell, rotten	0
2. Structure	
a) structure of leaves and stem maintained	4
b) structure of leaves and stem poor	2
c) structure of leaves and stem very poor, greasy, slimy or light mould formation or light soiling	1
d) leaves and stems rotten or heavy mould formation or heavy soiling	0
3. Colour	
a) colour of silage corresponds to that of the parent material if silage from clover, grass-clover etc. also light browning	2
b) colour little changed, light yellow to brownish	1
c) colour heavily changed, poisonous green or light yellow decolourised or heavy mould formation	0
4. Grade of quality	
1 excellent	20-18 points
2 good	17-14 points
3 average	13-10 points
4 moderate to bad	9- 5 points
5 spoiled	4- 0 points
5. General hints	
The key concentrates on the judgement and evaluation of few external characteristics but which are definitely perceptible. That is why intermediate points at evaluating the different characteristics of smell, structure and colour must not be given.	
The judgement of silage results mainly from its smell; the structure and to a small extent the colour are comprised as a support.	

Anexo B. Solución Fibra Detergente Neutro.

Reactivo	Cantidades
Borato de sodio	68.1 g
Fosfato disodico.	45.6 g
EDTA	186.12 g
Sulfato Lauril sódico	1070 mL
Ethylenglicolmomoethylether	100 mL
Volumen Total	10 l

Anexo C. Solución Fibra Detergente Acida

Reactivo	Cantidades
H ₂ SO ₄	274.75 mL
Hexadecyltrimethyl Amonium Bromide.	200 g
Volumen Total	10 l

Anexo D. Protocolo Extracción con CTAB.

EXTRACCION CON CTAB

1. En un tubo Falcon de 15 mLdeposite 500 mg de macerado fino de tejido liofilizado. Golpee el fondo del tubo suavemente para que el contenido se compacte levemente.
2. Adicionar 5 mL de Buffer de extracción a 60°C y 50 mg de polyvinylpyrrolidone (PVP 40,000) mezclar durante 10 segundos con vórtex.
3. Incubar a 60 °C durante 60 minutos. Mezclar invirtiendo el tubo cada 10 minutos aproximadamente
4. Deje los tubos 5 minutos a temperatura ambiente. (20°C)
5. Adicionar 6 mL de Cloroformo: Isoamyl alcohol (24:1), mezclar por inversión
6. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 20 minutos
7. Recupere el sobrenadante en un tubo nuevo y repita el paso anterior
8. agregue 1/2 volúmenes 5 M de NaCl mezcle y adicione 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar los ácidos nucleicos. mezclar suavemente por inversión.

9. Incube a -20°C toda la noche
10. Centrifugar a 3000 r.p.m durante 6 minutos
11. Descarte el sobrenadante y lave el pellet con etanol frio al 70%
12. Secar el pellet
13. Disolver en 300 µl de TE
14. adicione a cada muestra 3 µl de RNasa A [10 mg/ mL] incube por 1 hora
15. adicione a cada muestra 3 µl de Proteinasa K [1 mg/ mL] incube por 30 min
16. Adicionar 150 µl de Fenol y 150 µl de Cloroformo, a cada muestra y mezcle por inversión
17. Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 15 minutos
18. Recupere el sobrenadante en un tubo nuevo
19. agregue 1/10 volúmenes 2 M de Na acetato, mezcle y adicione 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar los ácidos nucleicos. mezclar suavemente por inversión. Deje toda la noche a -80°C
20. Posteriormente adicionar 650 µl de Cloroformo: Alcohol Isoamyl (24:1) mezclar por inversión NO USE VÓRTEX.
21. Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 20 minutos, descarte el sobrenadante.
22. Enjuague suavemente el precipitado en 500 µl etanol al 70% frio y elimine en alcohol con cuidado de no ir a desprender el pellet
23. Secar el pellet. Asegurarse de no dejar restos de etanol en el tubo.
24. Resuspender el pellet en 50 µl de TE
25. Verificación en gel de agarosa al 0.8%

Fuente:(Porebski, et al., 1997)

Anexo E. Condiciones para la amplificación de la región 16S rDNA

Reactivos	inicial	final	Vol 1X
Agua			28.8 µl
Buffer	5	1	10 µl
dATP, dCTP, dGTP y dTTP mM (Promega®)	2	0.2	5 µl
MgCl ₂ mM	25	1.5	3 µl
Cebadores Com1 mM	10	0.2	1 µl
Cebadores Com 2 ph mM	10	0.2	1 µl
Flexi go Taq Polimerasa Promega® u/ µl	5	1	0.2 µl
ADN 10 ng/ µl			1 µl

TOTAL

50 µl

Anexo F. Programa para la amplificación de la región 16S rDNA

Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95°C	15 minutos
29 ciclos	94°C	30 segundos
29 ciclo	50°C	60 segundos
29 ciclo	72°C	70 segundos
1 extensión final de	72°C	7 minutos

Anexo G. Protocolo Wizard® PCR Preps DNA Purification Resin (Promega Corporation)

PROCOLO PURIFICACION ADN

1. En un tubo de 1.5 mL adicionar 100 µl de Direct PCR Purification Buffer
2. Adicionar 50 µl del producto PCR
3. Vortex por 1 minuto
4. Adicionar 1 mL de resina
5. Vortex por 3 minutos
6. Mezclar por inversión 1 minuto
7. Preparar Wizard® Minicolumnas por cada muestra
8. Ensamblar la jeringa con la minicolumna Wizard®
9. Colocar la mezcla en la jeringa con la minicolumna y el tubo Eppendorf
10. Aplicar al vacío
11. Adicionar 2 mL de Isopropanol al 80% frío en la jeringa
12. Aplicar al vacío por 30 segundos
13. Centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos
14. En un tubo nuevo, adicionar 50 µl de agua di destilada a la minicolumna
15. Dejar reposar por un minuto
16. Verificar que el agua haya quedado en contacto con la membrana de la minicolumna
17. Centrifugar a 10000 rpm por 28 segundos a 20 C
18. Refrigerar la muestra a -20 C verificar en gel de agarosa al 1.5 %

fuelle: www.promega.com

Anexo H. Condiciones para la digestión con enzima Lambda exonucleasa

Reactivos	1X
Buffer (λ) Exonucleasa	4 μ l
(λ) Exonucleasa	0,5 μ l
H2O BIDEESTILADA	5,5 μ l
ADN	10 μ l
TOTAL	20 μl

Anexo I. Protocolo Limpieza con Fenol-Cloroformo

PROTOCOLO FENOL:CLOROFORMO (1:1)

1. Agregar 1 volumen de Fenol-Cloroformo 1:1
2. Mezclar NO USE VORTEX
3. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos
4. En un tubo nuevo recuperar el sobrenadante
5. Adicionar un volumen de Cloroformo
6. Mezclar NO USE VORTEX
7. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos
8. En un tubo nuevo recuperar el sobrenadante
9. Adicionar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frio para precipitar
10. Mezclar NO USE VORTEX
11. Incubar a -20 por 1 hora
12. Centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos
13. Descarte el sobrenadante
14. Secar el etanol en speedvac
15. Resuspender en 12,5 µL de TE a pH 7,6.

Fuente. Orita et al., 1989

Anexo J. Concentración Del Gel MDE

Concentración	0.7X
MDE 2x	8.75 mL
TBE 10x	2.5 mL
H2o Bidestilada	13,75 mL
Temed	20 µl
APS 10%	200 µl
Total	25 mL

Anexo K . Protocolo de Tinción Plata

Protocolo de Tinción Plata

1. Los vidrios con el gel son sumergidos en una bandeja con solución fijadora (ácido acético 10%) se retiran los vidrios y se coloca con agitación constante durante 20 min.

Nota: se puede reutilizar esta solución.

2. Se lava con agua bidestilada por 5 min. Con agitación constante
3. Se vuelve a lavar con agua bidestilada por 5 min. Con agitación constante
4. Se adiciona la Solución Tinción con plata (0.1% AgNO₃) por 30 min. Con agitación constante y en oscuridad (tapando la bandeja).

Nota: esta solución se puede reutilizar por 7 Veces

5. Se lava el gel con agua bidestilada por 5 segundos. Con agitación constante
6. Se introduce el gel en la solución reveladora (Na₂CO₃, formaldehído 37%, tiosulfato de sodio 10mg/mL) por 10 min. Con agitación constante

Nota: esta solución se debe de encontrar a 4° C para obtener un buen revelado y debe ser en constante oscuridad (tapando la bandeja).y no se puede reutilizar Evite exponer la solución a la luz. Agregue el formaldehído a la solución en la campana de extracción.

Almacene a 4 °C.

7. Se sumerge el gel en solución de parada por 5 min. Con agitación constante
8. Se lava con agua bidestilada por 3 minutos. Con agitación constante
9. Se vuelve a lavar con agua normal por 3 min. Con agitación constante
10. Se le adhieren al papel Hidratado a ambos lados del gel y se coloca a secar por 1 día.

Nota Importante:

NUNCA arrojar la solución de Nitrato de Plata (Solución de Tinción) al vertedero. Después de usar la solución de tinción y cuando ya se vaya a eliminar, adicionar 5 gr de NaCl por litro/sln, dejar decantar y filtrar con papel filtro Whatman y descartar los desechos orgánicos.

Fuente: Promega Inc Madison, Wisconsin., USA

Anexo L. TBE 10X

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidades</u>
Tris Base	108g
Ácido Bórico	55g
EDTA 0.5M	40mL
<u>Volumen Total</u>	<u>2000 mL</u>

Anexo M. Buffer de Extracción.

Reactivos	Concentración final	volumen
CTAB	3%	3 gr
EDTA 0.5M pH 8.0	20 mM	4 mL
Tris-HCl 1M pH 8.0	100 mM	10 mL
NaCl	1.4 M	8.18 gr
PVP-40	1%	1 gr
Volumen final		100 mL

Nota: Adicionar el PVP-40 minutos antes de la extracción

Anexo N. Buffer de Carga 2X (Amersham, 1994).

Reactivos	Concentración final	volumen
Formamida	95%	47.5 mL
EDTA (0.5M; pH 8.0)	20mM	2 mL
Azul de Bromofenol	0.05%	0.025 gr
Xilencianole FF	0.05%	0.025 gr
TOTAL	2X	50 mL

Anexo O. Geles de agarosa

% Gel	Agarosa (g)	TBE 10X (mL)
2	2,4	6
1,5	1,8	6
0,8	0,96	6
Volumen final		120 mL

Anexo P. Solución Fijadora o de parada

Reactivos	Concentración final	volumen
Ácido Acético	10%	100 mL
H ₂ O Bidestilada		900 mL
Volumen final		1000 mL

Anexo Q. Solución Reveladora

Reactivos	volumen
Na ₂ CO ₃	30 g
Formaldehído 37%	1,3 mL
Tiosulfato de sodio	185,8 µl
H ₂ O Bidestilada	1000 mL
Volumen final	1000 mL

Nota: Evite exponer la solución a la luz. Almacene a 4°C

Anexo R. Solución Tiosulfato

Reactivos	volumen
Tiosulfato de sodio	0,1 g
H ₂ O Bidestilada	10 mL
Volumen final	10 mL

Nota: Evite exponer la solución a la luz. Almacene a 4°C

Anexo S. Solución nitrato de plata

Reactivos	volumen
AgNO ₃	1 g
H ₂ O Bidestilada	1000 mL
Volumen final	1000 mL

Anexo T. Protocolo de Digestibilidad in vitro

Protocolo Digestibilidad <i>in vitro</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar ±0.5 g de muestra molida que ha sido pasada por un tamiz de 1mm dentro de un Erlenmeyerde 250 mL 2. Agregar 25 mL de solución tampón fosfato 0.1M, pH 6.0 3. Mezclar lentamente 4. Adicionar 10 mL de HCL 0.2 M 5. Ajustar el pH a 2.0 con la ayuda de HCL 1M y NaOH 1M 6. Agregar 1mL de pepsina 7. 0.5 mL de Cloramfenicol 8. Cerrar el Erlenmeyer con papel parafilm 9. Colocar a baño maría a 39°C por 2 horas 10. Pasadas las 2 horas 11. Agregar 10 mL de solución tampón fosfato 0.2M, pH 6.8 12. Mezclar lentamente 13. Adicionar 5 mL de NaOH 0.6 M 14. Ajustar el pH a 6.8 con la ayuda de HCL 1M y NaOH 1M 15. Mezclar lentamente 16. Agregar 1mL de pancreatina 17. Cerrar el Erlenmeyer con papel parafilm 18. Colocar a baño maría a 39°C por 4 horas 19. Transferir el residuo de los Erlenmeyer con agua destilada al sistema de filtración de vacío usando crisoles filtrantes porosidad 2 (P₂) 20. Lavar durante 3 min (por 2 veces) el residuo con 10 mL de etanol al 96%y por 2 veces con 10 mL de acetona al 99.5% 21. Secar el crisol en la estufa a 60°C por 24 hora s
Fuente: (Leterme & Estrada, 2008)

Anexo U. Solución KH₂PO₄ 0.1 M

Reactivos	volumen
KH_2PO_4	13.609 g
H ₂ O Bidestilada	1000 mL
Volumen final	1000 mL

Anexo V. Solución Na₂HPO₄ 0.1 M

Reactivos	volumen
Na_2HPO_4	14.196 g
H ₂ O Bidestilada	1000 mL
Volumen final	1000 mL

Anexo W. Buffer Fosfato 0.1M pH 6.0

Reactivos	volumen
Na_2HPO_4	125 mL
KH_2PO_4	875 mL
Volumen final	1000 mL

Anexo X. Solución KH₂PO₄ 0.2 M

Reactivos	volumen
KH_2PO_4	27.218 g
H ₂ O Bidestilada	1000 mL
Volumen final	1000 mL

Anexo Y. Solución Na₂HPO₄ 0.2 M

Reactivos	volumen
Na ₂ HPO ₄	28.392 g
H ₂ O Bidestilada	1000 mL
<u>Volumen final</u>	<u>1000 mL</u>

Anexo Z. Buffer Fosfato 0.2M pH 6.8

Reactivos	volumen
Na ₂ HPO ₄	495mL
KH ₂ PO ₄	505mL
<u>Volumen final</u>	<u>1000 mL</u>

Anexo AA. Solución Pepsina.

Reactivos	volumen
Pepsina Porcina (2000 FIP MERK)	25 g
HCL 0.2 M	1 mL
<u>Volumen final</u>	<u>1 mL</u>

Anexo BB. Solución Cloranfenicol

Reactivos	volumen
Cloranfenicol (SIGMA No C-0378)	0.5 g
Etanol %	100mL
<u>Volumen final</u>	<u>100 mL</u>

Anexo CC. Solución Pancreatina Porcina

Reactivos	volumen
Pancreatina Porcina	
(Nivel N-Sigma No P-1750)	0.1 g
Etanol 96%	0.5 mL
Acetona 99.5%	0.5 mL
Volumen final	1 mL
