

Efecto de la utilización de inóculos microbianos sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica, consumo voluntario y digestibilidad de la materia seca y nutrientes de ensilaje de maíz

Por

Viviana Rivera Burgos

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

INDUSTRIA PECUARIA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2013

Aprobado por:

Abner Rodríguez Carías, Ph. D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

John Fernández Van Cleve, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Paul RandelFølling, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Luis C. Solórzano, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

José R. Latorre, Ph. D.
Director Departamento de Industria Pecuaria

Fecha

Hipólito O'Farrill Nieves, Ph.D.
Representante Escuela Graduada

Fecha

Resumen

El forraje es la principal fuente de alimentación y de gran importancia económica para rumiantes en ambientes tropicales como Puerto Rico. El uso de ensilaje se ha estudiado extensamente en ambientes templados pero hay menos información sobre su producción y uso en el trópico. Este estudio constó de dos partes, en la primera se evaluó los efectos de la adición de dos inóculos microbianos comerciales, uno a base de bacterias productoras de ácido láctico (BPAL) homofermentativas (THO) y el otro una combinación de éstas con heterofermentativas (THH), además de un tratamiento control sin inoculación (TCN), sobre las características fermentativas de maíz tropical en micro-silos y la estabilidad aeróbica (EA) del ensilaje resultante. En la segunda parte se evaluó un tratamiento (THTF) con la adición de BPAL de ambos tipos contra un control (TCRL) sin tal adición, tocante a los efectos sobre las características fermentativas de maíz ensilado en bolsas plásticas y la EA del ensilaje. Se incorporó cada ensilaje en combinación con heno de gramíneas tropicales (HGT) en proporción 50:50 en base seca (BS) y harina de soya en dietas para ovinos, cuyo consumo voluntario (CV) y digestibilidad se determinó. Las características fermentativas se determinaron en muestras por triplicado, tomadas a diferentes largos de fermentación, que se analizaron para pH, concentración de ácidos orgánicos y NH_3 . Para evaluar la EA se monitoreó los cambios de pH y temperatura del ensilaje frecuentemente durante la exposición al aire por 5 días. En la prueba *in vivo* se utilizó 10 ovinos adultos alojados en jaulas metabólicas y la técnica de recolección fecal total en un diseño reversible. Se ofreció diariamente una cantidad de dieta BS equivalente a 3 % de peso vivo (PV) animal,

En el experimento 1, no se encontró diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los criterios de características fermentativas incluidas. Numéricamente el THO

mostró en promedio el menor pH (4.23) y el mayor contenido porcentual de ácido láctico (AL) (2.18), seguido respectivamente por THH (4.28 y 2.11) y TCN (4.32 y 1.94). Referente a los indicadores de EA tampoco difirieron significativamente los tratamientos, pero hubo una diferencia en pH promedio del ensilaje expuesto, favorable a THO (5.30 vs 5.43 valor común en ambos THH y TCN); y una tendencia ($P < 0.15$) en temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$) favorable a THH (29.61 vs 30.26 en THO y 30.28 en TCN).

En el experimento 2, el ensilaje de THTF dio mejores resultados que el control durante la fermentación, tanto en pH promedio (4.58 vs. 4.92, $P < 0.01$) como en contenido porcentual de AL más alto (1.64 % vs 1.29, $P < 0.06$) y de ácido propiónico (AP) más bajo (0.05 vs 0.10; $P < 0.04$). El THTF demostró eficiencia para mejorar la EA relativo al control al lograr valores promedios más bajos ($P < 0.05$) en pH (5.33 vs 6.65) y temperatura (32.06 vs 34.16 $^{\circ}\text{C}$) en el ensilaje expuesto al aire. En la prueba con los ovinos la dieta control resultó en mayor ($P < 0.05$) consumo de HGT y de forraje total, pero el ensilaje con adición de inóculo fue consumido en mayor cantidad, aunque por un margen de solo 8 g de materia seca (MS) por día. La digestibilidad de materia seca (DMS) y la digestibilidad de fibra detergente neutro (DFDN) no difirió entre tratamientos, pero la digestibilidad de proteína bruta (DPB) favoreció ($P < 0.05$) la dieta con ensilaje de maíz inoculado.

En general, el uso de los inóculos de BPAL en ensilaje de maíz tropical no resultó en grandes diferencias relativo a ensilaje no inoculado en las variables dependientes bajo estudio referentes a características fermentativas, EA y valor nutritivo al incorporarse en dietas para ovinos, si bien se detectó ciertos efectos beneficiosos de pequeña magnitud. No obstante existe mucha variabilidad por lo que las conclusiones presentes son tentativas y pendientes verificación por estudios adicionales.

Abstract

Forage, the main feed source, is of great economic importance in ruminant livestock operations in tropical environments such as Puerto Rico. Utilization of silage has been studied extensively in temperate environments however, less information is available about its production and use in tropical environments. This study consisted of two parts, the first evaluated the effects of adding two commercial microbial inoculants, one (treatment HOT) based on lactic producing acid bacteria (LAPB) of the homolactic type (HOB) and the other treatment (HHT) a combination of HOB with heterolactic bacteria (HHB), plus a control treatment without inoculation (CNT), on the fermentative characteristics of tropical maize in micro-silos and aerobic stability (AS) of the resulting silage. In the second part, a treatment (HTFT) based on the addition of both types of LAPB and a control without such addition (CRLT) were evaluated for their effects on the fermentation characteristics of maize silage produced in plastic bags and AS of the same. Each silage was combined 50:50 with tropical grass hay on a dry matter basis (DMB), and with soybean meal, in diets for sheep, in which voluntary intake and nutrient digestibility were determined. The fermentative characteristics were determined in triplicate samples taken at various lengths of fermentation, which were analyzed for pH, concentration of organic acids and NH_3 . To assess AS, changes in pH and temperature of the silages were monitored frequently during exposure to air for 5 days. The *in vivo* trial used 10 adult sheep housed in metabolic cages and the total fecal collection technique in a reversible design. The daily dietary offering was equivalent to 3% of animal live weight on a DMB.

In Experiment 1, no significant differences were found among treatments in any of the fermentation characteristics studied. Treatment HOT showed the numerically lowest average pH (4.23) and the highest average percentage content of lactic acid (LA) (2.18), followed by HHT

(4.28 and 2.11) and CNT (4.32 and 1.94), respectively. Also, regarding indicators of AS there were no significant differences among treatments, but numerically the average pH of exposed HOT silage was lower (5.30 vs 5.43, the common value in both HHT and CNT) and there was a trend ($P < 0.15$) toward lower average temperature ($^{\circ}\text{C}$) in favor of HHT (29.61 vs. 30.26 and 30.28 for HOT and CNT silages).

In experiment 2, the HTFT silage gave better results than the control during fermentation both in average pH (4.58 vs. 4.92, $P < 0.01$) and higher contents (%) of LA 1.64 vs 1.29 ($P < 0.06$) and lower of propionic acid (0.05 vs 0.10, $P < 0.04$). The HTFT showed efficacy for improving AS relative to the control with lower average values ($P < 0.05$) in pH (5.33 vs 6.65) and temperature (32.06 vs. 34.16 $^{\circ}\text{C}$) in silage exposed to air. In the trial with sheep, the CRLT diet resulted in higher ($P < 0.05$) consumption of hay and total forage, but the inoculated silage was consumed in greater quantity although by a margin of only 8 g of dry matter (DM) / d. The digestibility of DM and neutral detergent fiber (NDF) did not differ between treatments, but crude protein digestibility was higher ($P < 0.05$) for the diet including inoculated silage.

In general, the use of LAPB inoculants in tropical maize silage did not result in large differences relative to non-inoculated silage in the dependent variables under study regarding fermentation characteristics, AS and nutritive value, when incorporated into diets for sheep, although certain small beneficial effects were detected. However, there is much variability involved and present conclusions are tentative pending further study.

Dedicatoria

Este trabajo es dedicado a toda mi familia, comenzando por mis padres: Elizabeth Burgos Forti y Luis E. Rivera Martínez, por brindarme la vida y por estar siempre presente en todo momento, apoyando cada paso y decisión que tome. También se lo dedico grandemente a mi abuelo, Zoilo Burgos Avilés y mi abuela Carmen Ana Forti, por esperar pacientemente cada fin de semana de vuelta a mi pueblo Coamo, donde siempre recibo constantemente sus consejos y los valores de vida. A mi hermana, Ileana Rivera Burgos, por su liderazgo y ser la pieza clave de motivación y ejemplo; mi hermano menor, Luis E. Rivera Burgos quien además de hermano, es amigo quien cada día me llena de orgullo. A mi tía, Carmen I. Burgos, ¡Gracias Titi por ser mi madre sustituta! Ayudándome y apoyándome en todo mi curso académico. Mi prima Roxana (Pugui) Pérez, por ayudarme y siempre estar presente cuando más necesitaba. Por último, pero no el menos importante, a mi casi marido Alan Medina Montero. Gracias 'Flaco' por toda tu paciencia en soportar mis momentos de estrés e insoportables y que aun así siempre buscabas la manera de calmarme y poder llevar a cabo mis objetivos y metas.

¡Gracias, Los Amo!

Agradecimientos

Agradezco primero a la vida, por permitirme la oportunidad de estar presente hoy-día, desarrollándome para ser mejor persona por medio de la experiencia y los errores.

Al Dr. Abner Rodríguez Carías, presidente del comité graduado, quien fue la persona clave en desarrollarme profesionalmente mediante experiencias en el área de investigación y la expansión de conocimientos obtenidos desde sub-graduado. En adición, por su paciencia y por brindarme su apoyo y conocimientos. Estoy eternamente en deuda con usted.

A mi comité, Dr. John F. Van Cleve, Dr. Paul Randel Folling, Dr. José Latorre y Dr. Luis Solórzano por dedicar de su tiempo en la revisión y correcciones de este documento. Además de su cátedra y confianza.

Un agradecimiento ENORME a todos mis compañeros de maestría, principalmente; Carlos Rosario, Giovanna Emanuelli, Enrique Martínez, Natalia (Changa) Alejandro, Samuel (Shamu) Prieto, Orlando (Pimpio) Ortega, por el compañerismo, los nachalos en Sand's, amanecías, y por su apoyo y ayuda incondicional. Hermosos recuerdos me llevo de ustedes. ¡GRACIAS!

Al Sr. Ariel Muñoz y el personal de la Finca Alzamora y del Departamento de Industria Pecuaria, gracias por su ayuda, tiempo, comprensión y amistad.

Por último, a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en mi desarrollo profesional y personal durante mi grado de maestría. ¡Muchas GRACIAS!

Tabla de Contenido

Contenido	Páginas
Resumen	ii
Abstract	iv
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Tabla de Contenido	viii
Lista de Abreviaturas	x
Lista de Cuadros	xiii
Lista de Figuras	xiv
1.0. Introducción	1
2.0. Objetivos	3
3.0. Revisión de Literatura.....	4
3.1. Ensilaje	4
3.2. Proceso Fermentativo Durante la Producción de Ensilaje	4
3.2.1. Fase Aeróbica	4
3.2.2. Fase Anaeróbica	5
3.2.3. Fase de Almacenamiento	5
3.2.4. Fase de Alimentación	5
3.3. Bioquímica del Ensilaje	6
3.3.1. Carbohidratos Solubles en Agua	6
3.3.2. Capacidad Amortiguadora.....	7
3.3.3. Ácidos Orgánicos	7
3.3.4. Compuestos Nitrogenados	8
3.4. Microbiología del Ensilaje	8
3.4.1. Bacterias Productoras de Ácido Láctico	8
3.4.2. Enterobacterias	12
3.4.3. Clostridia	12
3.4.4. Hongos y Levaduras	12
3.4.5. Listeria.....	13

3.5. Aditivos de Inoculo Microbiano para Ensilaje	13
3.5.1. Bacterias Homofermentativas	14
3.5.2. Bacterias Heterofermentativas.....	15
3.6. Características del Ensilaje y Henilaje Tropicales	16
3.7. Consumo Voluntario y Digestibilidad de Nutrientes de Ensilajes.....	16
4.0. Materiales y Métodos.....	19
4.1. Experimento 1	
Efecto de la utilización de inóculos comerciales conteniendo bacterias productoras de ácido láctico sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de ensilaje de maíz	19
4.1.1 Material Vegetativo	19
4.1.2. Proceso de Fermentación	20
4.1.3. Estabilidad Aeróbica	22
4.2. Experimento 2	
Características fermentativas, estabilidad aeróbica, consumo y digestibilidad de nutrientes de ensilaje de maíz tropical tratado con un inóculo comercial conteniendo bacterias productoras de ácido láctico tipo homofermentativas y heterofermentativas	24
4.2.1 Material Vegetativo	24
4.2.2. Características Fermentativas	25
4.2.3. Consumo Voluntario y Digestibilidad de Nutrientes	27
4.2.4. Estabilidad Aeróbica	30
5.0. Resultados y Discusión	32
5.1. Experimento 1	32
5.1.1 Composición Química	32
5.1.2. Características Fermentativas	33
5.1.3. Estabilidad Aeróbica	38
5.2. Experimento 2	43
5.2.1. Composición Química	43
5.2.2. Características Fermentativas	43
5.2.3. Consumo Voluntario y Digestibilidad de Nutrientes	48
5.2.4. Estabilidad Aeróbica	52
6.0. Conclusiones	55
7.0. Referencias	56

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido acético
AB	Ácido butírico
AGV	Ácidos grasos volátiles
AL	Ácido láctico
AP	Ácido Propiónico
AMB	Ambiente
BHH	Bacterias homofermentativas
BHO	Bacterias heterofermentativas
BPAA	Bacterias productoras de ácido acético
BPAL	Bacterias productoras de ácido láctico
BS	Base seca
CFDN	Consumo de fibra detergente neutro
CPB	Consumo proteína bruta
CSA	Carbohidratos solubles en agua
CV	Consumo voluntario
CVect	Consumo voluntario de ensilaje sin aditivo
CVEin	Consumo voluntario de ensilaje con aditivo
CVhn	Consumo voluntario de heno
CVT	Consumo voluntario total
DCA	Diseño completamente aleatorizado
DFDN	Digestibilidad de fibra detergente neutro
DMS	Digestibilidad de materia seca
DPB	Digestibilidad de proteína bruta
EA	Estabilidad aeróbica

EEA	Estación experimental agrícola
EO	Ensilaje ofrecido
ETOH	Etanol
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
GLM	General linear model (Modelo Lineal General)
HC	Hemicelulosa
HGT	Heno de gramíneas tropicales
MI	Materia inorgánica
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
NNP	Nitrógeno no proteico
PB	Proteína bruta
PV	Peso vivo
TCN	Tratamiento sin aditivo o control (Expto. 1)
TCRL	Tratamiento sin aditivo o control (Expto. 2)
THH	Tratamiento con adición de BPAL homo- y heterofermentativas (Expto. 1)
THO	Tratamiento con adición de BPAL Homofermentativas (Expto. 1)
THTF	Tratamiento con adición de BPAL homo- y heterofermentativas (Expto. 2)

Abbreviation List

AS	Aerobic Stability
CNT	Control without additive treatment (Exper. 1)
CRLT	Control without additive treatment (Exper. 2)
DM	Dry matter
DMB	Dry matter basis
DMD	Dry matter digestibility
HHB	Heterolactic bacteria
HHT	Homo- and heterolactic inoculant treatment (Exper. 1)
HOB	Homolactic bacteria
HOT	Homolactic inoculant treatment (Exper. 2)
LA	Lactic acid
LAPB	Lactic acid producing bacteria
NDF	Neutral detergent fiber
HTFT	Homo- and heterolactic inoculant treatment (Exper. 2)

Lista de Cuadros

Páginas

Cuadro 1. Bacterias productoras de ácido láctico encontradas en el ensilaje	9
Cuadro 2. Composición química inicial del maíz (<i>Zea mays</i>) inoculado con uno de los inóculos microbianos y el control sin inocular	33
Cuadro 3. Efecto de la aplicación o no de inóculos microbianos sobre los valores medios de pH y productos de fermentación de maíz ensilado bajo condiciones de laboratorios en un ambiente tropical	34
Cuadro 4. Efectos combinados de tratamiento experimental y largo fermentación sobre los valores medios de pH y productos de fermentación en ensilaje de maíz tropical tratado o no con inóculos microbianos	36
Cuadro 5. Efecto principal de la adición de inóculos microbianos sobre los valores medios de pH y temperatura de ensilaje de maíz expuesto a condiciones aeróbicas	39
Cuadro 6. Efectos combinados del periodo de exposición aeróbica y los tratamientos experimentales sobre los valores medios de pH y temperatura de ensilaje de maíz	40
Cuadro 7. Efecto combinado promedio de largo de fermentación y tratamientos experimentales a través del largo de exposición aeróbica sobre el pH y temperatura de ensilaje de maíz	42
Cuadro 8. Composición química inicial del maíz antes de ensilar	43
Cuadro 9. Efecto principal de la aplicación o no de inóculo sobre las características fermentativas medias en ensilaje de maíz tropical	45
Cuadro 10. Efectos combinados de largo de fermentación y aplicación de inóculo sobre la concentración de productos de fermentación y pH en ensilaje de maíz tropical	47
Cuadro 11. Composición química de heno de gramíneas y dietas incluyendo ensilaje de maíz con y sin inóculo microbiano ofrecidos a los corderos.....	48
Cuadro 12. Consumo diario y digestibilidad aparente de ensilaje de maíz tropical con y sin inóculo de BPAL	51
Cuadro 13. Efecto principal de la aplicación de inóculo microbiano sobre el pH y temperatura durante la exposición aeróbica en ensilaje de maíz	52
Cuadro 14. Efectos combinados del periodo de exposición aeróbica y la aplicación de inóculos microbianos sobre el pH y temperatura de ensilaje de maíz.....	53

Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1. Ruta de metabolización de una hexosa por bacterias homofermentativas	10
Figura 2. Ruta de metabolización de glucosa y fructosa por bacterias heterofermentativas	11
Figura 3. Microsilos con válvulas de gas	21
Figura 4. Proceso de picado del maíz tropical utilizando una máquina comercial	24
Figura 5. Bolsa de ensilaje de 70 galones y muestreo de forraje utilizando un “Master Forage Probe”	26
Figura 6. Jaulas experimentales provistas de comederos dobles y bebederos.....	28
Figura 7. Recolección de muestras de heces durante el periodo de colección de datos	29
Figura 8. Temperatura observada durante el periodo de exposición aeróbica en ensilaje de maíz de los tratamientos experimentales	41

1.0. Introducción

En Puerto Rico y otros países tropicales, el forraje es la fuente de alimentación más importante y económica para los rumiantes. Sin embargo, debido a los periodos de sequía que ocurren anualmente se tiene como efecto una disminución en la calidad y cantidad del mismo, por lo que es crucial la práctica de conservación de forraje, ya sea en forma de heno, ensilaje o henilaje.

En las últimas décadas se ha adoptado el uso de ensilaje y henilaje como una alternativa alimentaria durante periodos de sequía en Puerto Rico. La producción de los mismos ha ido incrementado a través de los años llegando al punto de remplazar la utilización de heno en diferentes fincas alrededor de la isla. El método de henilaje se realiza mayormente mediante el empaque, en pacas cilíndricas de forraje de gramíneas tropicales con tallos finos. Dichos forrajes deberían presentar una abundancia de hojas y alta producción de biomasa, pero generalmente resultan ser de bajo valor nutricional (González y Rodríguez, 2003). Por lo tanto es necesario evaluar otras especies forrajeras (i.e maíz, sorgo) para este propósito bajo condiciones locales.

La calidad del ensilaje producido está influenciada por el manejo y el tipo de forraje. Se ha demostrado que el ensilaje de gramíneas tropicales tiene pobres características fermentativas mayormente por su bajo contenido de carbohidratos solubles en agua (CSA), alto contenido de paredes celulares y alta capacidad amortiguadora (Aguilera et al., 1992). Además, se caracteriza por altas poblaciones de microorganismos epifíticos no deseables para participar en la fermentación del forraje (Rodríguez, 1996). El maíz es un cultivo muy usado como ensilaje y se presta para dicho propósito debido a su contenido óptimo de CSA, sin embargo, esta característica no siempre garantiza el logro de fermentaciones deseables. Asimismo, durante la fase de alimentación, el ensilado de maíz, como también otros ensilados que contienen granos, es

susceptible al deterioro o daños por microorganismos aeróbicos (Muck, 2004; Kung y Rajit, 2001).

Una alternativa para mejorar la fermentación y disminuir el deterioro aeróbico del ensilaje es mediante el uso de inóculos microbianos. Estos consisten generalmente de preparaciones de diferentes cepas de bacterias productoras de ácido láctico (BPAL), las cuales se han estudiado extensivamente en áreas templadas, pero cuyos efectos en la fermentación de forrajes en ambientes tropicales y húmedos como los de Puerto Rico son poco conocidos. Existen dos tipos de BPAL; homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras tienen la habilidad de ser más eficientes en la producción de ácido láctico, el cual constituye el principal agente acidificante durante el proceso fermentativo (Muck y Kung, 1997); mientras que el principal efecto beneficioso de las heterofermentativas es a mejorar la estabilidad aeróbica o reducir el deterioro del ensilaje durante su uso en la alimentación (Danner et al., 2003). La efectividad de estas bacterias deseables puede ser afectada por factores externos propios del medio ambiente local y por la composición físico-química y microbiológica de la planta ensilada (Schmidt y Kung, 2010). Se precisa evaluar el uso de estos inóculos microbianos en forrajes ensilados bajo ambientes tropicales para determinar su potencial, como posible alternativa para mejorar las dietas y por ende el desempeño productivo de los rumiantes locales. Esta investigación tuvo el objetivo de evaluar las características ensiladoras y nutricionales de ensilaje de maíz tropical inoculado con preparaciones comerciales que aportan cepas tipo homofermentativas y heterofermentativas de BPAL.

2.0. Objetivos

- 2.1.** Evaluar la adición de dos inóculos microbianos conteniendo bacterias productoras de ácido láctico, uno de homofermentativas solas y el otro de éstas en combinación con heterofermentativas, sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de ensilaje de maíz preparado bajo condiciones de laboratorio.

- 2.2.** Evaluar la adición de un inóculo microbiano conteniendo bacterias productoras de ácido láctico de tipos homofermentativa y heterofermentativa sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario y digestibilidad *in vivo* de ensilaje de maíz.

3.0. Revisión de la Literatura

3.1. Ensilaje

El ensilaje es un método de conservación de forraje, utilizado larga y extensivamente en regiones templadas y que va integrándose en los sistemas de producción animal en Puerto Rico. El mismo se lleva a cabo mediante la conversión de nutrimentos fermentables a ácidos orgánicos (AL, AA y AP) por bacterias anaeróbicas (Muck, 2004; Kung y Rajit, 2001). Entre los ácidos orgánicos producidos, el láctico es el más favorable por crear un ambiente ácido ($\text{pH} < 4$), lo que evita el crecimiento de microorganismos no deseables y preserva los nutrientes originales del forraje (Kung y Rajit, 2001; Muck y Pitt, 1998). El forraje ensilado sufre diferentes cambios químicos, físicos y microbiológicos durante la fermentación. La obtención de un buen ensilaje exige controlar una serie de factores claves.

3.2. Proceso fermentativo durante la producción de ensilaje

El proceso de ensilaje se divide en cuatro fases: aeróbica, anaeróbica, almacenamiento y alimentación (Charlery, 2006; Muck, 2004).

3.2.1. Fase Aeróbica: Una vez cosechado y ensilado el forraje, las células y los tejidos de la planta continúan por un tiempo con su proceso de respiración utilizando el oxígeno que está atrapado en la materia vegetal. Mientras haya oxígeno presente en el silo, las enzimas de las plantas continúan sus funciones sin que ocurra cambios drásticos en el pH (Regan, 2000; Oude Elferink et al., 1999). Igualmente ocurre hidrólisis de los nutrientes por la actividad de microflora epifítica de la planta que incluye microorganismos facultativos y anaeróbicos como

enterobacterias, hongos, levaduras y BPAL (Regan, 2000; McDonald et al., 1991).

3.2.2. Fase Anaeróbica: El crecimiento exponencial de microorganismos anaeróbicos comienza al disminuir la presencia de oxígeno en la masa de forraje. Bacterias productoras de ácido acético (BPAA) inician la fermentación y la disminución del pH, lo que crea un ambiente ideal para la dominación de BPAL. La utilización de los CSA por las bacterias anaeróbicas resulta en la producción principalmente de ácido láctico y ácidos grasos volátiles (AGV) acético, propiónico y butírico (AB) así como etanol y CO₂. Si se logra una buena fermentación, la presencia de estos ácidos (principalmente AL) causa un descenso drástico en el pH (3.5 - 5.0), el cual inhibe los microorganismos no deseables (Kung y Rajit, 2001; Regan, 2000, Muck y Pitt, 1994;).

3.2.3. Fase de Almacenamiento: Luego de lograr una buena producción y acumulación de AL por medio de la fermentación y a condición de que se mantenga la anerobiosis, las condiciones acidificadas continúan aportando protección contra microorganismos no deseables (i.e. levaduras y clostridios). Sin embargo, siempre existe la posibilidad que con el tiempo éstos se activan y utilizan compuestos nitrogenados, los carbohidratos residuales y AL como sustratos, teniendo como efecto la producción de otros productos tales como AB y amoníaco, en detrimentos de la calidad del ensilaje.

3.2.4. Fase de Alimentación: Tan pronto el silo se abre y se expone el ensilaje al aire en el proceso de ofrecérselo a los animales, los microorganismos aeróbicos comienzan a utilizarlo como medio de crecimiento. La libre disponibilidad de oxígeno facilita el metabolismo de nutrientes solubles, tales como azúcares residuales y AL. Consecuentemente puede ocurrir el deterioro progresivo del ensilaje que se manifiesta por incrementos en el pH y la generación de calor, con efecto negativo sobre la aceptación animal y el consumo voluntario.

3.3. Bioquímica del Ensilaje

El forraje cosechado y ensilado, sufre cambios químicos durante el proceso de fermentación en dependencia de la disponibilidad de CSA, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, la capacidad amortiguadora del forraje y los microorganismos asociados al proceso.

3.3.1. Carbohidratos Solubles en Agua

Los carbohidratos son compuestos orgánicos que se componen de carbono, hidrógeno y oxígeno y cuya unidad básica son los monosacáridos. Su fuente de origen es la fotosíntesis y su función principal en una planta es proveerle energía para posibilitar reacciones bioquímicas vitales. Además, sirven como materia prima estructural y se almacenan como reservas. Los carbohidratos más sencillos tienden a ser solubles en agua fría. En las gramíneas forrajeras de áreas templadas es común encontrar reservas en forma de fructosanos en las hojas y tallos, y en forma de almidón en las semillas, mientras en pastos tropicales la planta almacena los carbohidratos mayormente como almidón también en las partes vegetativas (Van Soest, 1994). Durante el desarrollo vegetativo de la planta, los CSA se van acumulando y cambiando su composición hasta el momento de la inflorescencia, cuando los mismos comienzan a decrecer

(Kruse, et al., 2008; Phipps y Weller, 1979). El hecho que los carbohidratos son el principal sustrato en la respiración de la planta y también en el metabolismo de los microorganismos asociados con el proceso fermentativo, hace crucial que durante la fase anaeróbica del ensilaje, las BPAL actúen rápidamente evitando así la competencia de los microorganismos no deseables, lo que facilita la utilización eficiente de los carbohidratos disponibles en la planta durante la fermentación.

3.3.2. Capacidad Amortiguadora

La capacidad amortiguadora se define como la cantidad de mili-equivalentes de iones de hidrogeno (H^+) utilizados para disminuir el pH de un peso dado de forraje desde neutral a ácido $pH < 6$; (Playne y McDonald, 1966). En general indica la resistencia a la acidificación que tienen los componentes orgánicos e inorgánicos presentes en el forraje durante la fermentación (Ruiz y Ruiz, 1990). Una alta capacidad amortiguadora es un obstáculo para la rápida acidificación que se desea al ensilar un forraje.

Forrajes frescos con alto contenido de proteínas (i.e. leguminosas) tienen alta capacidad amortiguadora y requieren mayor contenido de CSA para generar AL y reducir el pH durante la fermentación, en comparación a forrajes con baja capacidad amortiguadora (i.e. gramíneas).

3.3.3. Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos se hallan presentes en las frutas, hojas, tallos y raíces de las plantas y su concentración varía según la edad de los mismos. Los forrajes inmaduros presentan mayor contenido de ácidos orgánicos el cual disminuye a medida que madura la planta (Van Soest, 1994). Los principales ácidos orgánicos encontrados en las plantas son los cítrico, málico, succínico y oxálico.

Ciertas bacterias anaeróbicas tienen la capacidad de fermentar citrato ya sea en presencia o ausencia de carbohidratos solubles. Durante la fermentación para hacer ensilaje estos ácidos orgánicos son rápidamente degradados por BPAL con la formación de productos de fermentación como acetato, etanol y CO₂. (Beck, 1978).

3.3.4. Compuestos Nitrogenados

Luego de cosechado el forraje comienza la degradación parcial de proteínas vegetales por medio de enzimas proteolíticas de la planta (Muck, 1988). Los microorganismos también participan en la proteólisis, la cual se mantiene activa durante la fermentación. La degradación de proteínas, genera otros compuestos nitrogenados no proteicos (NNP), como amoníaco y aminoácidos (McEniry et al., 2008; Rooke y Hatfield, 2003; Weinberg et al., 2001). Microorganismos anaeróbicos tales como BPAL, *Clostridium* y *Enterobacteria* pueden fermentar compuestos nitrogenados con efectos negativos sobre el ensilamiento eficaz de un forraje (McEniry et al., 2008; Östling y Lindgreen, 1995). Una reducción rápida del pH del forraje limita la acción de las proteasas de la planta y disminuye la acción de microorganismos proteolíticos no deseables para la fermentación.

3.4. Microbiología del Ensilaje

3.4.1. Bacterias Productoras de Ácido Láctico

Las BPAL son Gram-positivas, no esporuladas, tolerantes a la acidez y productoras de ácido láctico por la fermentación de azúcares (Wessels et al., 2004). En las plantas frescas se encuentran presentes bacterias epifíticas de diferentes géneros, tales como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Pasebani et al., 2010; Paul

Ross et al., 2002), pero generalmente la población no es lo suficiente para promover una fermentación óptima. Las BPAL se dividen en homofermentativas y heterofermentativas (Cuadro 1). Las primeras producen dos moles de ácido láctico por cada mol de hexosa fermentado (Figura 1) y son las mayores responsables de reducir el pH en el ensilaje. Las heterofermentativas son capaces de producir ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂ mediante la fermentación de glucosa (Figura 2). Se ha recomendado la utilización de ambos tipos de BPAL como aditivos con miras a mejorar la fermentación y estabilidad aeróbica y se venden preparaciones de las mismas a los productores de forrajes conservados.

Cuadro 1. Bacterias productoras de ácido láctico encontradas en el ensilaje

Homofermentativas	Heterofermentativas
<p>Lactobacillus</p> <p><i>L. acidophilus</i></p> <p><i>L. casei</i></p> <p><i>L. coryniformis</i></p> <p><i>L. curvatus</i></p> <p><i>L. plantarum</i></p> <p><i>L. salivarius</i></p> <p>Streptococcus</p> <p><i>S. bovis</i></p> <p>Pedicoccus</p> <p><i>P. acidilactici</i></p> <p><i>P. damnosus</i></p> <p><i>P. pentasaceus</i></p> <p>Lactococcus</p> <p><i>L. lactis</i></p> <p>Enterococcus</p> <p><i>E. faecalis</i></p> <p><i>E. faecium</i></p>	<p>Lactobacillus</p> <p><i>L. brevis</i></p> <p><i>L. buchneri</i></p> <p><i>L. fermentum</i></p> <p><i>L. viridescens</i></p> <p>Leuconostoc</p> <p><i>L. mesenteroides</i></p>

Adaptado de McDonald et al. 1991

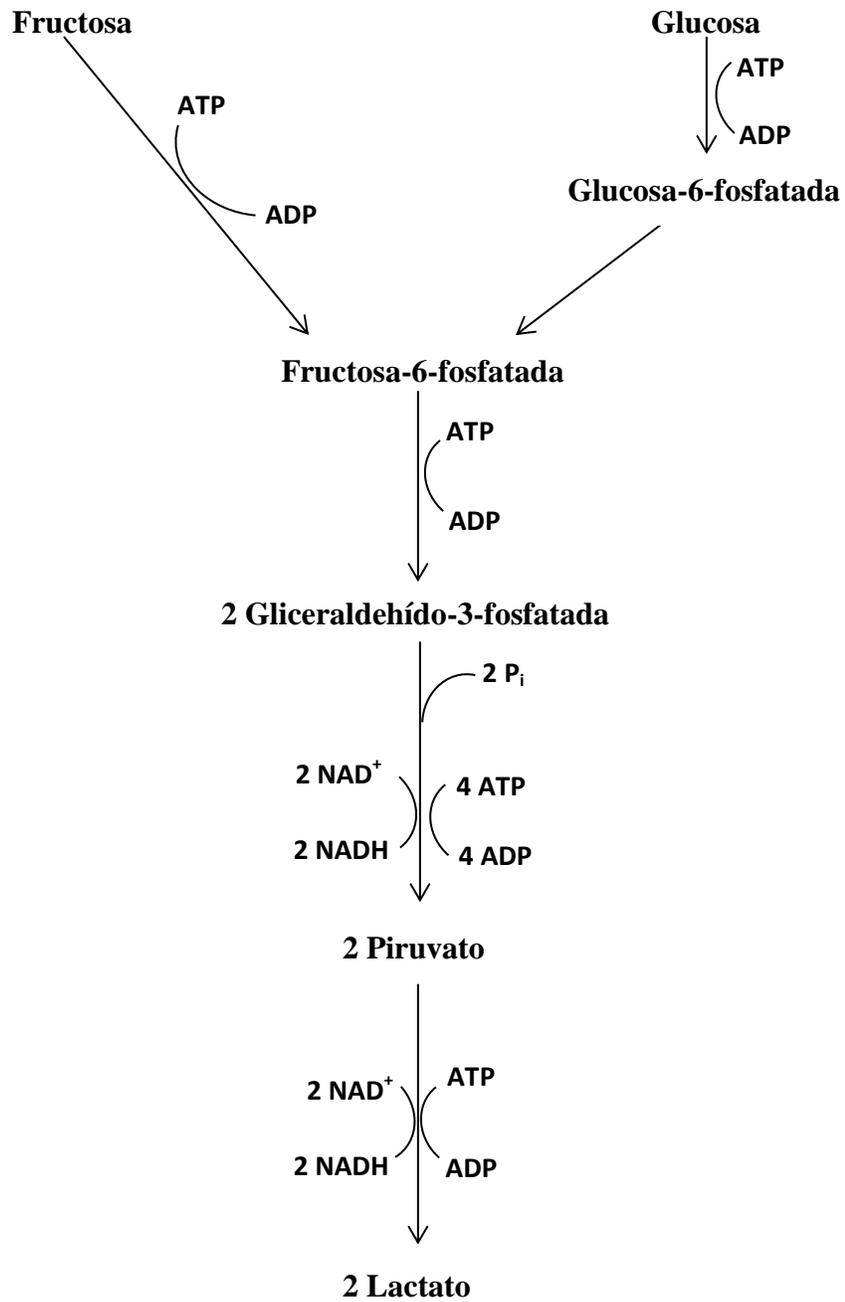


Figura 1. Ruta de metabolización de una hexosa por bacterias homofermentativas (Adaptado y traducido de McDonald et al., 1991)

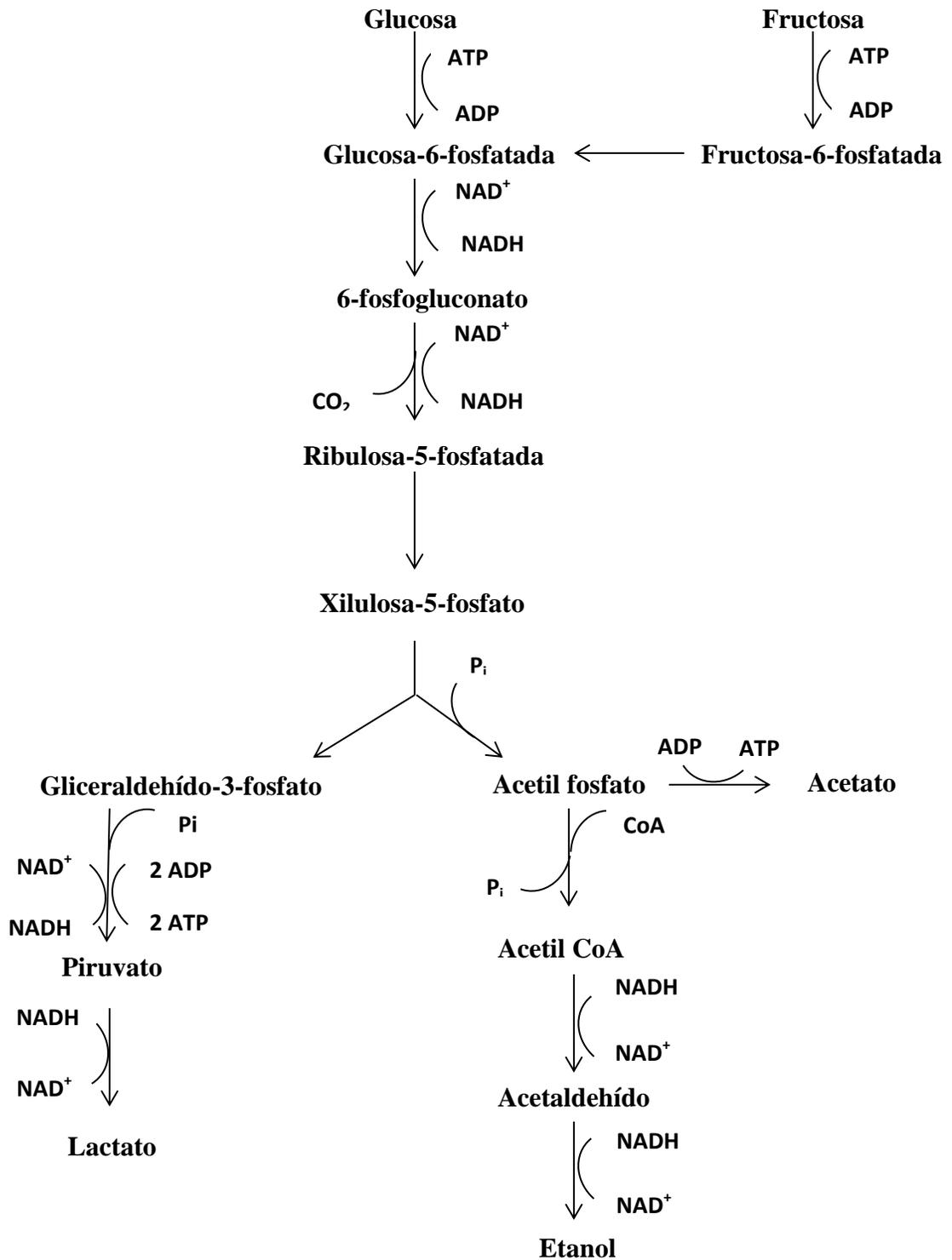


Figura 2. Ruta de metabolización de glucosa y fructosa por bacterias heterofermentativas (Adaptado de McDonald et al., 1991)

3.4.2. Enterobacteria

Las enterobacterias son Gram negativas y anaeróbicas facultativas que suelen estar presentes en la microflora de la planta en cantidades pequeñas y en mayores poblaciones en forrajes abonados con excremento. Usualmente su actividad ocurre en la primera fase de la fermentación y conduce a una pobre calidad del ensilaje (Östling y Lindgren, 1991). Estas bacterias convierten los azúcares en ácido acético y etanol, lo que es indeseable ya que así compiten para los mismos sustratos que utilizan las BPAL (Beck, 1978).

3.4.3. Clostridia

Se trata de bacterias Gram positivas, esporuladas y que crecen en condiciones anaeróbicas con la habilidad de fermentar azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, produciendo AB y amoníaco. Su presencia en el ensilaje resulta generalmente de contaminación con suelo. Crecen en ambientes húmedos, a altas temperaturas, bajo contenido de CSA y alta capacidad amortiguadora del forraje (McDonald et al., 1991). Su presencia en el ensilaje es detrimental ya que utilizan azúcares y proteínas como sustrato producen butirato, y consecuentemente ocasionan un aumento en el pH, favoreciendo así el crecimiento de otros microorganismos no deseables.

3.4.4. Hongos y Levaduras

Los hongos son microorganismos heterotróficos que pueden crecer en colonias multicelulares y que están presentes en el suelo, en la planta y en el agua. La mayoría de los hongos son aeróbicos pero algunos pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas. Tienen la habilidad de degradar azúcares, ácido láctico y algunos componentes de la pared celular de las

plantas (McDonald et al., 1991). Su crecimiento en los ensilajes puede ser controlado mediante condiciones anaeróbicas y ácidas. Es común observar la presencia de estos microbios en áreas del ensilaje expuestas al aire (i.e cara del ensilaje). Varias especies de hongos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) producen toxinas, tales como aflatoxinas, (zeralenona), que perjudican la salud del animal que las consuma. (Black et al., 1992)

Las levaduras son microorganismos unicelulares que están presentes de forma epifítica. Bajo condiciones aeróbicas, su crecimiento poblacional es acelerado y pueden utilizar diferentes sustratos como lactato, acetato, citrato, malato, succinato, propionato y etanol. Contrario de los hongos, las levaduras pueden crecer en ambientes ácidos (McDonald et al., 1991). Las levaduras que degradan AL en presencia de oxígeno son los responsables principales de ocasionar el deterioro del ensilaje, aumentando el pH y proveyendo un ambiente ideal para el crecimiento de otros microorganismos aeróbicos como bacterias y hongos (Kung, 2005; McDonald et al., 1991).

3.4.5. Listeria

Estas bacterias patogénicas son Gram positivas, esporulentas, móviles y aeróbicas facultativas. Son responsables de algunas enfermedades en los animales (meningitis, encefalitis, septicemia y abortos) pero pueden ser controladas en los ensilajes mediante buena fermentación, y estricta anaerobiosis (McDonald et al., 1991).

3.5. Aditivos de Inóculos Microbianos Para Ensilaje

Con el objetivo de mejorar las características fermentativas y la estabilidad aeróbica de forrajes fermentados existen diferentes aditivos de tipo biológico y químico. Entre éstos los más utilizados y estudiados extensivamente son los aditivos biológicos, que incluyen los inóculos

microbianos. Estos productos tienen la ventaja de ser naturales, no causar problemas ambientales y no ser corrosivos para los equipos. En adición potencialmente ayudan a mejorar no solamente la fermentación del ensilaje sino también la digestibilidad en los rumiantes que los consumen (Adesogan et al., 2004). En algunos estudios la utilización de estos productos ha aumentado el consumo del ensilaje por los animales y su productividad y eficiencia productiva (Jatkasuskas et al., 2008). La respuesta positiva o negativa al uso de los inóculos microbianos, referente a la calidad del ensilaje obtenido, es variable dependiendo del tipo y viabilidad de las bacterias presentes (homofermentativas y heterofermentativas) en los mismos y el material vegetativo a ser inoculado.

3.5.1. Bacterias Homofermentativas

Las bacterias homofermentativas producen ácido láctico a partir de glucosa y tienen efectos beneficiosos sobre las características fermentativas del ensilaje. La adición de bacterias de este tipo en el ensilaje ha resultado en una mayor disminución del pH durante la fermentación debido a la alta producción de ácido láctico (Muck y Kung Jr., 1997) y en una mayor recuperación de la energía y materia seca originales (Kung Jr., 2000). Dos de las bacterias homofermentativas comúnmente presentes en inóculos microbiales son *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*. *L. plantarum* aumenta la concentración de ácido láctico durante las etapas iniciales de la fermentación (Hu et al., 2009). Por su parte, *E. faecium* produce sustancias bacteriocinas que protegen e inhiben la contaminación del forraje por otros microorganismos (Marcinakova et al., 2008). Sin embargo, se ha observado que el uso de inóculos de bacterias homofermentativas no es necesariamente efectivo para promover la estabilidad aeróbica del ensilaje y consecuente pérdida de nutrientes (Kleinschmit et al., 2005). El deterioro aeróbico

también disminuye el consumo voluntario y desempeño productivo del animal con efectos económicos adversos (Whitlock et al., 2000; Hoffman y Ocker, 1997). Por lo tanto se ha sugerido utilizar inóculos microbianos que combinan bacterias homofermentativas y heterofermentativas.

3.5.2. Bacterias Heterofermentativas

Las bacterias heterofermentativas producen, además de ácido láctico, ácido acético, CO₂ y etanol. Una de las bacterias de este tipo más estudiadas para uso en los ensilajes es *Lactobacillus buchneri*. Esta bacteria es útil como inóculo porque tiene la capacidad de convertir el ácido láctico en ácido acético bajo condiciones anaeróbicas (Danner et al., 2003; Driehuis et al., 1999). El ácido acético mejora la estabilidad aeróbica en diferentes ensilajes por sus características antimicóticas (Danner et al., 2003; Oude Elferink et al., 2001). Relativo a las bacterias homofermentativas, la heterofermentativas son menos eficientes en la conservación de nutrientes pero mejoran la estabilidad aeróbica en ensilajes de maíz (Hu et al., 2009; Filya et al., 2006; Ninshino et al., 2004; Rajit y Kung, 2000), alfalfa (Kung et al., 2003), sorgo (Tabacco et al., 2010) y centeno (Driehuis et al., 1999).

Diferentes estudios también indican un efecto positivo sobre el proceso fermentativo y la estabilidad aeróbica cuando se usan inóculos que combinan bacterias homo y heterofermentativas en ensilajes de maíz (Huisden et al., 2009), sorgo (Filya et al., 2004) y alfalfa (Kung et al., 2003). Adesogan et al., (2004) reportaron que la inoculación de pasto Bermuda (*Cynodon spp.*) con *P. pentosacerus* y *L. buchneri* mejoró la fermentación pero no tuvo ningún efecto sobre la estabilidad aeróbica del ensilaje resultante. Kang et al., (2009) observaron que la estabilidad aeróbica de ensilajes de maíz tratados con inóculos aportadores de *L. casei* y *L.*

buchneri variaba dependiendo del híbrido de maíz, Croplan Genetics 851RR2 comparado con Vigoro 61R36. El nivel de inoculación y las características inherentes de diversas especies forrajeras (i.e. contenido de CSA) podrían afectar la respuesta a estos aditivos (Adesogan et al., 2004; Aksu et al., 2004; Andrea et al., 2001)

3.6. Características de ensilajes y henilajes tropicales

Se ha adoptado la práctica de producir ensilaje y henilaje en numerosas fincas en Puerto Rico. Los ganaderos concernidos han optado por utilizar este modo de conservar forraje sobrante durante los meses de abundancia para aprovecharlo durante la época de sequía. La elaboración local de ensilajes y henilajes se realiza principalmente con gramíneas tropicales naturalizadas, abarcando mezclas de hierba Guinea (*Panicum maximum*), Pangola (*Digitaria decumbens*), Johnson (*Sorghum halepense*) y Buffel (*Cenchrus ciliaris*) entre otras. En general, estas gramíneas se caracterizan por sus altos contenidos de humedad y fibra, bajo contenido de CSA, diversidad en sus poblaciones de microorganismo epifíticas y relativamente alta capacidad amortiguadora (Rodríguez, 1996; Spiraleri et al., 1995). Estudios realizados bajo condiciones de laboratorio o en pacas cilíndricas han demostrado que las fermentaciones que sufren ensilajes y henilajes de gramíneas tropicales resultan en valores de pH altos (>5) acompañados de altas concentraciones de ácido acético y ácido butírico y bajo contenido de ácido láctico (Rosario, 2012; González y Rodríguez, 2003; Martínez-Fleitas, 1998; Arias-Carrasquillo, 1998; Rodríguez, 1996)

3.7. Consumo Voluntario y Digestibilidad de Nutrientes de Ensilajes

Según Baumont et al. (2000), el consumo voluntario se define como la cantidad máxima de alimento que está dispuesto a consumir un animal cuando se le ofrece el mismo *ad libitum*. Por

su parte, Illius y Jessop, (1996) lo describen como un fenómeno psicológico que comprende la integración de señales y refleja la flexibilidad de un sistema biológicamente evolucionado para sobrellevar la variabilidad en la disponibilidad de los alimentos y su composición así como el estado del animal. La respuesta del animal en términos de consumo y digestibilidad del forraje acusa los efectos de clima, características vegetales (genotipo, maduración) y abonamiento, como también el proceso mecánico y la altura de corte (Kennington et al., 2005; Andrea et al., 2001). En el caso de ensilaje, depende también de la calidad de la fermentación y sus efectos sobre la palatabilidad y características organolépticas (Wolf et al., 1993). Existe una lógica relación positiva entre el desempeño del animal y su nivel de consumo. No obstante es limitada la información científica sobre las propiedades de los ensilajes tropicales y su consumo y digestibilidad bajo condiciones de climas cálidos y húmedos.

Dulphy y Van Os (1996), mencionan que una pobre preservación del ensilaje con altos contenidos de productos de fermentación indeseables (ácidos grasos volátiles y compuestos nitrogenados formados por la degradación de proteínas) resulta en una disminución en el consumo. Se estimó una disminución de aproximadamente 17 % en el consumo de ensilaje con tales características al compararse con forraje fresco en ovinos (Dulphy y Michaelex-Doreau, 1981).

Entre los forrajes recomendados para ensilar en áreas tanto templadas como tropicales, el maíz y el sorgo se ha considerado por mucho tiempo los cultivos de mayor preferencia y excelencia. Sin embargo, la composición química del forraje influye grandemente sobre el consumo y ambos forrajes usualmente presentan mayor contenido de FDN bajo condiciones del trópico. Un alto contenido de FDN tiende a afectar negativamente el consumo y se ha visto este

fenómeno en vacas lactantes y en ganado de carne alimentados con ensilaje de maíz y otros cultivos (Tjardes et al., 2002; Nichols et al., 1998).

Por la digestibilidad aparente se entiende la desaparición de los nutrientes ingeridos durante su paso por todo el tracto gastrointestinal sin distinguir entre residuos dietéticos y metabólicos fecales. La digestibilidad de los forrajes se ve afectada por muchos factores y ha sido objeto de mucho esfuerzo investigativo (Kennington et al., 2005). En el caso de los forrajes fermentados se ha observado que la digestibilidad de la materia seca (DMS) y del FDN (DFDN) puede promoverse por la adición de inóculos de BPAL (Weinberg et al., 2007). En el trópico de Puerto Rico se ha estudiado poco los efectos del uso de inóculos de BPAL sobre el consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de forrajes ensilados. Dicha situación motivó la realización de la presente experimentación.

4.0. Materiales y Métodos

4.1. Experimento 1: Efecto de la utilización de inóculos comerciales conteniendo bacterias productoras de ácido láctico sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de ensilaje de maíz.

4.1.1. Material Vegetativo

Mecánicamente se cosechó el maíz (*Zea mays var. mayorbella*) de 90 días de crecimiento en la subestación Experimental Agrícola (EEA) localizada en el municipio de Isabela, P.R. (Longitud 67.05 N; Latitud 18.46 W). Se transportó el forraje a la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, donde se cortó en partículas de 2-3 pulgadas de largo utilizando una máquina comercial (Craftsman 305cc Drop Down Chipper/Shredder). Se colectaron muestras en triplicado del material vegetativo fresco picado (día 0) para determinar el pH y la composición química inicial. Para la determinación de la concentración de iones de hidrogeno (pH) se pesaron 50g de muestra y se mezcló con 450 ml de agua deionizada (pH neutro). La solución se homogenizó durante 2 minutos utilizando un equipo homogenizador (Stomacher; 3500 Seward), y posteriormente se filtró el líquido a través de una tela de tejido abierto. El efluente obtenido sirvió para la medición de pH utilizando un medidor de pH equipado con un electrodo de combinación (pH/Ion 510, Eutech Instruments/Oakton Instruments), que fue estandarizado con soluciones amortiguadoras comerciales de pH 4, 7 y 10 (Fischer Scientific). El contenido porcentual de la materia seca (MS), materia inorgánica (MI), materia orgánica (MO; 100-MI), proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y hemicelulosa (FDN-FDA) se determinó utilizando métodos estándares (AOAC, 1990; Van Soest et al., 1991). Para la determinación del contenido de CSA se envió una muestra al laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab, Ithaca, NY).

4.1.2. Proceso de fermentación

El material vegetativo picado se asignó a uno de tres tratamientos experimentales: (1) sin aditivo (TCN), (2) inóculo con un aditivo microbiano de BPAL tipo homofermentativas (THO) y (3) con un aditivo microbiano de BPAL de los dos tipos homo y heterofermentativos (THH). El aditivo de THO contenía cepas de *Lactobacillus plantarum*, mientras que el del THH incluía cepas de *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*. Ambos aditivos se usaron a los niveles recomendados por el manufacturero para proveer 1×10^5 ufc/g. Se diluyó cada aditivo en agua desionizada y luego se aplicó a porciones del material vegetativo picado previamente pesadas, utilizando rociadores plásticos y se mezcló manualmente. En el tratamiento TCN se le añadió la misma cantidad de agua y se mezcló manualmente con el forraje como en los otros casos para obtener homogeneidad. Se utilizaron microsilos hechos de tubos PVC (Figura 3) con una capacidad de 1.2 kg de forraje, provisto con una válvula para la liberación de gases. Se llenaron un total de 36 microsilos (12 silos con el material vegetativo de cada uno de los tres tratamientos) y se compactó manualmente para asegurar condiciones anaeróbicas. Los microsilos se mantuvieron a temperatura ambiente (28 - 30°C) bajo condiciones del Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas durante todo el proceso fermentativo.



Figura 3. Microsilo con válvula de gas

Para determinar los cambios en pH y productos de fermentación (concentración de ácidos orgánicos y de N-NH_3) durante el proceso fermentativo, se seleccionaron al azar tres microsilos por tratamiento para abrir a 4 periodos de fermentación establecidos (15, 30, 60 y 90 d). El pH del material vegetativo fermentado se determinó como previamente descrito en el forraje fresco. Para la determinación de ácidos orgánicos y N-NH_3 , muestras del efluente homogenizado se clarificaron por centrifugación durante 15 minutos y el líquido resultante se envió para análisis a un laboratorio comercial (Rock River Laboratory, WI). Además, se tomaron muestras de cada ensilaje correspondiente a cada tratamiento y día de fermentación para determinar su contenido de MS, MI, MO, PB, FDA, FDN, hemicelulosa y CSA utilizando la metodología previamente descrita.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el Modelo Lineal General de SAS (SAS Institute, 2004) según un diseño completamente aleatorizado (DCA) con un arreglo factorial 3

(Tratamientos) x 5 (Largo de Fermentación). La separación de las medias para establecer diferencias estadísticas se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de $P < 0.05$.

El modelo general usado con las variables pH, composición química y productos de fermentación fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable dependiente

μ = Media general estimada

α_i = Efecto del tratamiento (TCN, THO y THH)

β_j = Efecto del largo de fermentación (0, 15, 30, 60 y 90 d)

$\alpha\beta_{ij}$ = Interacción entre tratamiento * largo de fermentación.

ε_{ijk} = Error experimental.

4.1.3. Estabilidad Aeróbica

En los ensilajes resultantes correspondientes a cada tratamiento experimental a cada día de fermentación (15, 30, 60 y 90) se determinó la estabilidad aeróbica utilizando como criterios los cambios de pH y temperatura. Para cada combinación (tratamiento y día de fermentación) se tomaron muestras de 1000g del ensilaje de 3 silos diferentes y se colocaron las mismas en bolsas plásticas dentro de un envase de porexpán y expuestas a condiciones aeróbicas durante 5 días. Se monitoreaba la temperatura de los ensilajes, utilizando un termómetro situado en la masa fermentada cada 6 horas durante las primeras 24 (0, 6, 12, 18, 24 h) y cada 24 horas hasta completar los cinco días (48, 72, 96, 120 h). Además, en una muestra de ensilaje de cada

combinación (tratamiento y periodo de fermentación) se determinó el pH después de 0, 1, 3, y 5 días de exposición aeróbica utilizando la misma metodología mencionada anteriormente.

El análisis estadístico de los datos de pH siguió un diseño de parcelas divididas con un arreglo factorial de 3 (tratamientos; TCN, THO y THH) x 4 (periodos de fermentación: 15, 30, 60 y 90 d) x 4 (días de exposición aeróbica; 0, 1, 3, y 5). Con los datos correspondientes a temperatura se utilizó también un modelo de parcelas divididas con arreglo factorial de 3 (tratamientos; TCN, THO y THH) x 4 (periodos de fermentación; 15, 30, 60 y 90 d) x 9 (lecturas de temperatura; 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 h), utilizando el silo como medida repetitiva durante los 5 días de exposición aeróbica. La identificación de las medias de ambas variables que difirieron significativamente ($p < 0.05$) se realizó mediante Cuadrados Medios Esperados.

El modelo general utilizado con estas variables fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \beta\delta_{jk} + \alpha\delta_{ik} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijkl} = Variable dependiente (pH y temperatura)

μ = Media general estimada

α_i = Efecto del tratamiento (TCN, THM y THH)

β_j = Efecto del largo de fermentación (15, 30, 60 y 90 d)

δ_k = Efecto del día ó hora del exposición aeróbica

$\alpha\beta_{ij}$ = Interacción del tratamiento * largo de fermentación

$\beta\delta_{jk}$ = Interacción del largo de fermentación * día ó hora de exposición

$\alpha\delta_{ik}$ = Interacción del tratamiento * día ó hora de exposición

$\alpha\beta\delta_{ijk}$ = Interacción de tratamiento * largo de fermentación * día ó hora de exposición aeróbica

ϵ_{ijk} = Error experimental.

4.2. Experimento 2: Características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario y digestibilidad de nutrimentos de ensilaje de maíz tropical tratado con un inóculo comercial conteniendo bacterias productoras de ácido láctico tipo homofermentativas y heterofermentativas

4.2.1. Material Vegetativo

El maíz tropical (*Zea mays var. mayorbella*) fue cosechado mecánicamente a 105 días de crecimiento en la EEA de la Univesidad de Puerto Rico localizada en el municipio de Lajas (Lat. 18.05; Long. 67.05). Se cortó el forraje a una altura de aproximadamente 6 pulgadas sobre el suelo y se transportó a la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Allí se picó en partículas de 2-3 pulgadas de longitud utilizando una máquina comercial (Vermeer Model BC1230a) (Figura 4). Se colectaron muestras en triplicado del material fresco antes de ensilar para determinar la composición química en términos de pH, MS, MO, MI, PB, FDN, FDA y hemicelulosa (FDN-FDA), siguiendo los métodos previamente citados



Figura 4. Proceso de picado del maíz tropical utilizando una máquina comercial

El material vegetativo picado fue asignado a uno de dos tratamientos experimentales: sin aditivo (TCRL) y tratado con aditivo comercial combinando BPAL tipos homo y heterofermentativos (THTF). El inóculo comercial aportaba cepas de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* y se aplicó al material vegetativo a la dosis recomendada por el fabricante de 2.5×10^{10} ufc/g. El modo de aplicación al forraje picado siguió el procedimiento antes descrito. Se ensiló el material vegetativo inoculado y sin inocular en 24 bolsas de polietileno (12 bolsas por tratamiento) con una capacidad de 70 gal (265 L). Se tuvo la precaución de usar bolsas dobles para garantizar condiciones anaeróbicas. Estos silos improvisados se almacenaron bajo techo a temperatura ambiente en las facilidades del Proyecto de Pequeños Rumiantes localizado en la Finca Alzamora (Figura 5). El ensilaje resultante se sometió a evaluación de las características fermentativas, estabilidad aeróbica, consumo voluntario y digestibilidad *in vivo* de las fracciones MS, PB, y FDN.

4.2.2. Características Fermentativas

Se siguió el curso de los cambios en pH y productos de fermentación del ensilaje resultante de ambos tratamientos experimentales durante el proceso fermentativo que duró 45 d. Se abrieron y evaluaron tres silos por tratamiento seleccionados aleatoriamente después de los cuatro periodos de fermentación establecidos (7, 14, 28 y 45 d). De cada silo correspondiente a cada tratamiento y día de fermentación se tomaron cuatro sub-muestras utilizando un muestreador de forraje (Master Forage Probe, 2 pulgadas diámetro, Dairy One Forage Lab, Ithaca, NY) (Figura 5). Las muestras compuestas provenientes de cada combinación (tratamiento*longitud de fermentación) se analizaron para determinar el pH y los productos de fermentación (ácidos orgánicos y N-NH₃) según descrito previamente (Expto. 1).

Los datos experimentales se sometieron a análisis estadístico según un DCA con arreglo factorial de 2 (tratamientos) x 5 (largo de fermentación). El modelo utilizado con estas variables fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variables a dependiente (i.e. pH y productos de fermentación)

μ = Media general estimada

α_i = Efecto del tratamientos (TCRL y THTF)

β_j = Efecto del largo de fermentación (0, 7, 14, 28 y 45 d)

$\alpha\beta_{ij}$ = Interacción entre tratamiento * largo de fermentación.

ε_{ijk} = Error experimental



Figura 5. Bolsa de ensilaje de 70 galones y muestreo de forraje utilizando un “Master Forage Probe”.

4.2.3. Consumo Voluntario y Digestibilidad de Nutrientes

Para determinar el efecto del aditivo en el ensilaje de maíz, con respecto a su consumo voluntario (CV) y digestibilidad de la MS, PB y FDN, se utilizaron diez ovinos criollos previamente desparasitados con un peso vivo (PV) promedio de 19.2 kg. El ensilaje evaluado en esta prueba se dejó fermentar durante un mínimo de 45 días y se obtuvo de los mismos silos tipo bolsa utilizados para estudiar el efecto del inóculo sobre las características fermentativas. Los ovinos se alojaron en jaulas metabólicas individuales provistas de dos comederos individuales y una gaveta insertada debajo para la recolección de las heces (Figura 6). Las jaulas se hallaban bajo techo en el Proyecto de Pequeño Rumiantes de la Finca Alzamora. Se utilizó el peso vivo para calcular el ofrecimiento dietético total diario de cada animal, presumiendo un consumo en BS equivalente a 3 % del PV. Los ovinos se asignaron aleatoriamente a una de dos dietas experimentales que constaron de 50 % de heno de gramíneas tropicales (HGT) y 50% de ensilaje de maíz tratado o no con el inóculo. El HGT comercial se obtuvo de un productor local y constó de una mezcla de las hierbas guinea (*Panicum maximun*), pangola (*Digitaria decumbens*), Johnson (*Sorghun halepense*) y buffel (*Cenchrus ciliaris*). El heno se picó mecánicamente en pedazos de 2-3 cm de largo para disminuir la selectividad ingestiva de los animales. Además, durante el transcurso del experimento se le proveyó a cada ovino un bloque de sal mineralizado y 70 g de harina de soya diariamente con el propósito de satisfacer sus requisitos mínimos de PB. Había agua disponible *ad libitum*. Las dietas se ofrecieron a los ovinos en dos periodos de 19 d divididas en 12 d de adaptación a la dieta y 7 d de recolección de datos comparativos. Los animales cambiaron de tratamientos entre un periodo y el otro. Se gastaron los contenidos de un total de 6 silos por tratamiento en cada periodo experimental, con un promedio de 1 silo usado cada 5 días.



Figura 6. Jaulas experimentales provistas de comederos dobles y bebederos.

El ofrecimiento en partes iguales BS de los dos forrajes, HGT y ensilaje con o sin aditivo, previamente pesados, se realizó rutinariamente a las 8:00 am \pm 1 h. Durante cada periodo de colección de datos (7 d) se cuantificó diariamente el heno y los ensilajes ofrecidos y rechazados por cada ovino para determinar los consumos voluntarios de heno (CVhn), de ensilaje sin (CVEct) ó con aditivo (CVEin) y en total (CVT). Se calculó los cocientes de heno, consumido sobre total de heno ofrecido y sobre consumo voluntario total; y de cada ensilaje sobre su ofrecimiento y sobre el consumo total. Además, se calculó las relaciones de los consumos de PB y FDN procedente de heno, de ensilaje sin aditivo y de ensilaje con aditivo sobre el consumo total de PB y FDN.

Durante el periodo de toma de datos comparativos se recolectaron y pesaron diariamente la totalidad de las heces (Figura 7) de cada ovino y se guardó una alícuota (15%) para formar posteriormente una muestra compuesta para análisis químico. Se determinó el contenido de MS,

PB y FDN y la digestibilidad aparente de dichas tres fracciones. La tarea de recolección de las heces se facilitó por las bandejas para dicho propósito de las jaulas experimentales (Figura 7).



Figura 7. Recolección de muestras de heces durante el periodo de colección de datos

Los datos experimentales de CV y digestibilidad de MS, PB y FDN se analizaron según un diseño reversible con efectos fijos de la dieta (TCRL y THTF) y cinco repeticiones aleatorias (animal individual) por tratamientos en cada periodo. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un Modelo Lineal General (GLM) de SAS (SAS Institute, 2004).

El modelo general aplicable a las variables de consumo voluntario y digestibilidad fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y = Variable dependiente (Consumo y Digestibilidad de MS, PB, FDN)

μ = Media general estimada

α_i = Efecto del ovino

β_j = Efecto de la dieta (TCRL y THTF)

δ_k = Efecto del periodo experimental

ε_{ijk} = Error experimental

4.2.4. Estabilidad Aeróbica

La estabilidad aeróbica de los ensilajes correspondiente a cada tratamiento (con o sin inóculo) y fermentado durante 45 días, fue evaluada utilizando como criterio los cambios de pH y temperatura. Se seleccionaron al azar cuatro silo-bolsas de cada tratamiento de los cuales se tomaron una muestra de 800 g. Se colocaron las muestras en bolsas plásticas, situadas dentro de envases de porexpán y se dejaron expuestas a condiciones aeróbica durante tres días a temperatura ambiente bajo condiciones de laboratorio. Durante el periodo de exposición al aire se determinó cambios en temperatura utilizando un termómetro situado en el centro de la muestra de cada ensilaje y se tomaron lecturas después de 0, 2, 8, 14, 20, 26, 72, 90 y 96 h. Para determinar los cambios de pH, se tomaron muestras de cada ensilaje después de 0, 1 y 3 días de exposición al aire. La metodología usada para esta determinación fue la misma mencionada previamente.

El análisis estadístico de los datos de pH y temperatura correspondiente al periodo de exposición aeróbica siguió un diseño de parcelas divididas con un arreglo factorial de 2 tratamientos x 3 periodos de exposición aeróbica (0, 1 y 3 d) para pH y 2 (tratamientos) x 9 lectura para temperatura (0, 2, 8, 14, 20, 26, 72, 90 y 96 h), utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2004).

El modelo general utilizado con estas variables fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable a determinarse (pH y temperatura)

μ = Media general estimada

α_i = Efecto del tratamiento (TCRL y THTF)

β_j = Efecto del día ó hora del exposición aeróbica

$\alpha\beta_{ij}$ = Interacción del tratamiento * día ó hora del exposición aeróbica

ε_{ijk} = Error experimental.

5.0. Resultados y Discusión

5.1. Experimento 1

5.1.1. Composición química

El pH y la composición química inicial del forraje utilizado en este experimento antes de ensilar (Cuadro 2) coincide con valores reportados previamente para maíz cosechado en el trópico de Puerto Rico (Prieto-Prieto, 2007; Sandoval, 2007; Arias-Carrasquillo, 1998). Al combinar los resultados obtenidos con los tres tratamientos el material vegetal tuvo un pH promedio inicial de 6.45 y contenidos porcentuales promedios de 41.14, 94.56 y 5.44 de MS, MO y MI a BS, respectivamente. El contenido promedio de varias fracciones orgánicas fue 5.77 % PB; 4.67 % CSA; 57.16 % FDN, 36.1 % FDA y 21.07 % hemicelulosa (HC). La MS inicial citado (41%) se considera moderadamente alta, ya que excede la recomendación para este tipo de forraje de 32 a 38 (Huisden et al., 2009; Charley, 2006).

La aplicación del inóculo microbiano antes de ensilar no debe haber tenido mucho efecto sobre la composición química inicial del forraje de maíz tropical, pero se observó una diferencia ($P < 0.05$) de 3.8 puntos de porcentaje en HC entre TCN y THO y variación entre 54.9 y 60.7 % en FDN que no alcanzó significación ($P > 0.05$; Cuadro 2). No existe otra explicación para estas discrepancias que no sea variabilidad en el muestreo y la determinación de la fracción FDN, que habrá afectado el estimado de HC también dado el modo de su cálculo (FDN-FDA). El valor EEM de 15.0 % obtenido en el análisis de los datos de FDN evidencia esta situación.

Cuadro 2. Composición química inicial del maíz (*Zea mays*) inoculado con uno de los inóculos microbianos y el control sin inocular¹

Componente	Tratamiento			EEM ⁵	P
	TCN ²	THO ³	THH ⁴		
pH	6.58	6.26	6.5	0.05	0.28
Fracción Química (%)					
MS	41.99	41.41	40.03	7.55	0.69
MO ⁷	94.5	94.48	94.71	0.21	0.82
MI ⁷	5.5	5.52	5.29	0.23	0.82
PB ⁷	5.57	5.63	6.13	0.41	0.53
FDA ⁷	37.4	36.37	34.47	8.84	0.51
FDN ⁷	60.7	55.87	54.9	15.01	0.23
HC ^{6,7}	23.3 ^a	19.5 ^b	20.43 ^{ab}	1.85	0.03
CSA ^{7,8}	4.29	4.82	4.73	0.33	0.42

¹ Media de 3 repeticiones, ² Control, ³ Ensilaje tratado con BPAL Homoláctica, ⁴ Ensilaje tratado con BPAL Homo- y Heteroláctica, ⁵ Error Estandar de la Media, ⁶ Hemicelulosa=FDN-FDA, ⁷ Base Seca, ⁸ Carbohidratos Soluble en Agua, ^{a, b} Medias con diferentes letras en la misma fila difieren (P<0.05)

5.1.2. Características Fermentativas

Los inóculos bacterianos se añaden al forraje con el propósito de estimular la producción de ácido láctico durante las etapas iniciales de fermentación y así mediante una acelerada reducción de pH asegurar la preservación del ensilaje. El efecto esperado de las cepas bacterianas tipo homofermentativas (i.e. *L. plantarum* y *E. faecium*) es mejorar el proceso de fermentación mediante una acelerada acidificación. Sin embargo, su efecto puede variar según las características inherentes del forraje (composición química y microflora epifítica) y las condiciones ambientales donde se realiza el proceso (Rodríguez, 1996). En este experimento no se observó grandes efectos de la aplicación de los dos inóculos evaluados sobre las características fermentativas del ensilaje de maíz obtenido en los tres tratamientos, ya que todos pueden catalogarse como indicativos de fermentación óptima (Cuadro 3; Charley, 2006).

Cuadro 3: Efecto de la aplicación o no de inóculos microbianos sobre los valores medios de pH y productos de fermentación de maíz ensilado bajo condiciones de laboratorio en un ambiente tropical¹

Componente	Tratamiento			EEM ⁵	P
	TCN ²	THO ³	THH ⁴		
pH	4.32 ^z	4.24 ^x	4.28 ^{xy}	0.01	0.14
Producto de fermentación					
Ácido láctico (%)	1.94	2.19	2.11	0.15	0.22
Ácido acético (%)	0.35	0.34	0.34	0.01	0.73
ETOH (%)	0.27	0.21	0.24	0.01	0.54
N-NH3/N-Total (%)	5.39	4.68	5.09	1.69	0.33
AL:AA	5.54	6.44	6.20	0.68	0.17

¹Media de 3 repeticiones, ²Ensilaje Control, ³Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas, ⁴Ensilaje tratado con BPAL homo- y heterolácticas, ⁵Error estándar de la media, ^{x,y,z}Medias con tendencias P<0.15

Los tres ensilajes presentaron en promedio un pH de 4.28 y contenidos porcentuales de ácido láctico de 2.08 (> 1.5), ácido acético de 0.34 (< 0.8), ETOH de 0.24 (<0.5) y la relación de N-NH3/N-Total de 5.05 (< 8), siendo los valores entre paréntesis los recomendados.

Rooke y Hatfield (2003), concluyen que ensilajes de maíz sin tratar con aditivos presentan típicamente una fermentación predominantemente homofermentativa, con pH bajo y óptima concentración de ácido láctico, además de baja concentración de ácido acético. Sin embargo, la utilización de inóculos microbianos que aportan BPAL homofermentativas es una práctica ampliamente recomendada y utilizada en escala comercial (Hu et al., 2009). En este estudio, el tratamiento THO tendió (P<0.15) a producir un ensilaje más ácido que el control (0.08 unidad de pH menor). Esta mayor acidez del ensilaje de THO, correspondió a un levemente mayor (P>0.05) contenido de ácido láctico que no alcanzó significación estadística, pero que resulta lógico (Cuadro 3). No se observaron efectos importantes de los tratamientos en las concentraciones de AL y etanol (ETOH) y tampoco efectos significativos (P>0.05) sobre las

variables N-NH₃/N-Total y AL:AA, pero la tendencia en estas favoreció el uso de los aditivos al indicar menor degradación de proteína y mayor predominación láctica.

La interacción entre tratamiento experimental y largo de fermentación en su efecto sobre las variables fermentativas evaluadas en este experimento (pH y productos de fermentación) careció de significación estadística en todo caso (Cuadro 4). Es decir que los ensilajes de los distintos tratamientos no fueron afectados diferencialmente por el paso del tiempo hasta los 90 d de fermentación. Referente al efecto principal de largo de fermentación, en general ya a los 15 d de fermentación se había establecido el patrón de resultados que perdurarían hasta los 90 d, sobretodo en el caso de pH, contenido de ETOH y proporción AL/AA. Las variables AL, AA y N-NH₃/N-Total mostraron una módica tendencia ascendente con el tiempo. Los efectos de esta variable independiente resultaron significativos ($P < 0.01$) excepto en el caso de la proporción AL/AA (Cuadro 4). En cambio, los tratamientos experimentales no ejercieron efectos significativos en ninguna de estas seis variables dependientes.

Teóricamente se esperaría que el material vegetativo inoculado con BPAL tipo homofermentativas (THO) o aquel inóculo con la combinación de bacterias tipo homo- y heterofermentativas (THH) resultaran en ensilajes con mayor acidez, aportada principalmente por AL, que el ensilaje control (TCN). La falta de observar semejante efecto en este experimento coincide con las observaciones de otros investigadores de que la adición de inóculos microbianos antes de ensilar no siempre resulta en ensilajes con mejores características fermentativas (Schmidt y Kung, 2010; Filya et al., 2004).

Cuadro 4. Efectos combinados de tratamiento experimental y largo de fermentación sobre los valores medios de pH y productos de fermentación en ensilaje de maíz tropical tratado o no con inóculos microbianos.

Componente	LF	Tratamiento			EEM ⁴	Probabilidad		
		TCN ¹	THO ²	THH ³		TRT	LF	TRT*LF
pH	0	6.58	6.26	6.50	0.011	0.14	<0.01	0.22
	15	3.82	3.77	3.78				
	30	3.74	3.74	3.72				
	58	3.72	3.68	3.67				
	90	3.75	3.77	3.76				
Productos de Fermentación (%)								
Ácido Láctico	0	0	0	0	0.154	0.22	<0.01	0.46
	15	2.29	2.51	2.58				
	30	2.23	2.52	2.13				
	58	2.25	2.71	2.08				
	90	2.92	3.20	3.66				
Ácido Acético	0	0	0	0	0.005	0.73	<0.01	0.39
	15	0.38	0.43	0.36				
	30	0.43	0.33	0.35				
	58	0.47	0.44	0.39				
	90	0.52	0.45	0.58				
ETOH	0	0	0	0	0.017	0.55	<0.01	0.36
	15	0.36	0.23	0.38				
	30	0.27	0.22	0.25				
	58	0.34	0.44	0.22				
	90	0.38	0.18	0.34				
N-NH3 / N-Total	0	2.44	1.6	2.3	1.691	0.33	<0.01	0.86
	15	5.46	4.65	4.45				
	30	5.24	4.29	5.29				
	58	7.00	6.00	6.84				
	90	6.82	6.84	6.55				
Proporción AL:AA	0	0	0	0	0.68	0.17	0.77	0.70
	15	6.03	5.84	7.17				
	30	5.19	7.64	6.09				
	58	4.79	6.16	5.33				
	90	5.62	7.11	6.31				

¹Control, ²Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas, ³Ensilaje tratado con BPAL Homo-y Heterolácticas,

⁴Error Estandar de la Media, TRT=Tratamiento, LF=Largo de Fermentación (Horas)

Filya et al. (2004), observaron que el maíz tratado con inóculos de bacterias homofermentativas (*L. plantarum* y *P. acidipropionici*) y fermentado durante 60 días, se transformó en ensilaje con mayores contenidos de AA y AP al compararlo con el control. También se ha demostrado variabilidad en la eficacia de bacterias heterofermentativas (i.e. *L. buchneri*) para mejorar las características fermentativas, lo que se achacó a factores externos (i.e. forraje, tipo de suelo; Schmidt y Kung, 2010).

Por su parte (Filya et al., (2006) y Adesogan et al., (2004) han señalado que dos resultados indicativos del efecto positivo esperado de las cepas bacterianas añadidas antes de ensilar son un aumento en la relación AL:AA y una reducción en la concentración de NH₃ respecto al ensilaje sin el inóculo. Estos efectos tampoco fueron prominentes en el presente experimento.

Ranjit y Kung (2000), no encontraron efectos de la inoculación con cepas de *L. plantarum* (30114 y 30115) sobre la fermentación en ensilaje de maíz y sugirieron que las cepas utilizadas poseían poca actividad comparado con las bacterias epifíticas (i.e. lactobacilos); microorganismos aparentemente dominantes en las etapas iniciales del proceso de ensilamiento.

Además de la posible competencia causada por las altas poblaciones de microorganismos epifíticos no beneficioso para la fermentación (i.e. levaduras, hongos) y hallados comúnmente en forrajes cosechados bajo condiciones tropicales, otras posibles características pertinentes que podrían modificar el efecto positivo de los aditivos microbianos incluyen su alta capacidad amortiguadora y voluminosidad, debido al alto contenido de paredes celulares. Otros estudios locales han demostrado la falta de eficiencia de estos productos al usarse con ensilajes de sorgo forrajero y hierba guinea (Rosario, 2012; Martínez-Fleitas, 1998)

5.1.3. Estabilidad Aeróbica

Forrajes ensilados en climas tropicales húmedos y cálidos podrían ser más susceptibles al crecimiento de microorganismos aeróbicos durante la fase de alimentación comparado con forrajes ensilados en climas templados (Pahlow et al., 2003). Rodríguez (1996) encontró que durante la exposición aeróbica las poblaciones de hongos y levaduras, que utilizan lactato como sustrato, fueron mayores en sorgo forrajero ensilado en ambientes tropicales que en climas menos cálidos y húmedos. La alta humedad y temperatura tienden a propiciar la proliferación de microorganismos asociados con el deterioro aeróbico (i.e. levaduras, hongos, bacterias). Se ha identificado a las levaduras aeróbicas como el principal tipo de microorganismo que participa en el deterioro de ensilajes hechos de plantas con alta proporción de granos como maíz, trigo y sorgo (Filya et al., 2004; Ashbell et al., 2002). Un mayor entendimiento de la actividad de inhibidores de estas levaduras, bacterias y hongos responsables de la inestabilidad de forrajes conservados sería un adelanto clave para superar este problema. Algunas observaciones indican que ensilajes tratados con bacterias homofermentativas son más inestables al ser expuestos al aire respecto a ensilajes sin inocular (Filya et al., 2006). Una posible explicación para esto es que el ácido láctico que se produce durante la fermentación se convierte en sustrato para microorganismos responsables del deterioro aeróbico (i.e. levadura; Wolt, 1989). Otros estudios apoyan el supuesto que la adición de inóculos bacterianos tipo heterofermentativos mejora la estabilidad aeróbica del ensilaje debido a una mayor concentración de ácido acético durante la fermentación, que al momento de exponer el ensilaje a condiciones aeróbicas exhibe propiedades antimicóticas que contribuyen a controlar los microorganismos asociados al deterioro aeróbico (Danner et al., 2003).

Cuadro 5. Efecto principal de la adición de inóculos microbianos sobre los valores medios de pH y temperatura de ensilaje de maíz expuesto a condiciones aeróbicas.¹

Componente ⁶	Tratamiento			EEM ⁵	P
	TCN ²	THO ³	THH ⁴		
pH	5.43	5.30	5.43	0.118	0.113
Temperatura (°C)	30.8 ^a	30.3 ^{ab}	29.61 ^b	0.207	0.002

¹Media de 3 repeticiones, ²Ensilaje Control, ³Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas, ⁴Ensilaje tratado con BPAL Homo- y Heterolácticas, ⁵Error estándar de la media, ⁶Medias con diferentes letras en la misma fila difieren (P<0.05)

El efecto principal del tratamiento sobre el pH de los ensilajes expuestos al aire no resultó significativo. Sin embargo, el ensilaje de THH tratado con bacterias homo- y heterofermentativas mostró una temperatura media menor (P<0.05) que el ensilaje control, sin diferir del ensilaje de THO inoculado con homofermentativas solas (Cuadro 5).

Referente al efecto del periodo de exposición aeróbica, se observó que a las 24 h el pH de los ensilajes tratados con ambos inóculos microbianos fue menor que el del control (Cuadro 6). Este efecto no persistió posteriormente y hasta los 5 días de exposición. Asimismo, relativo al control hubo menores aumentos de temperatura en el ensilaje de THO durante las primeras 18 h y el de THH hasta las 24 h, luego el efecto beneficioso de los inóculos desapareció. El efecto principal del largo de exposición fue significativa (P<0.01) sobre estas dos variables dependientes, pero no hubo efectos interactivos TRT*D significativos (P>0.05).

Cuadro 6. Efectos combinados del periodo de exposición aeróbica y los tratamientos experimentales sobre los valores medios de pH y temperatura de ensilaje de maíz

Componente ¹	D ⁵	Tratamientos			EEM ⁸	Probabilidad		
		TCO ²	THO ³	THH ⁴		TRT ⁷	D	TRT*D
pH	0	3.76	3.74	3.73	0.13	0.11	0.01	0.20
	1	4.02	3.8	3.75				
	3	6.78	6.5	6.89				
	5	7.19	7.16	7.35				
	H ⁶	TCO	THO	THH	EEM	TRT	H	TRT*H
Temperatura (°C)	0	27.44	26.57	26.38	4.46	0.01	0.01	0.67
	6	29.48	28.38	28.27				
	12	30	28.78	28.56				
	18	30.23	28.7	28.28				
	24	31.16	30.73	28.83				
	48	33.53	33.39	33.4				
	72	35.05	35.08	34.86				
	96	30.51	30.83	30.28				
	120	30.38	30.65	28.8				

¹Media de 3 repeticiones, ²Control, ³Ensilaje con BPAL Homolácticas, ⁴Ensilaje con BPAL Homo- y Heterolácticas, ⁵Día, ⁶Hora, ⁷Tratamiento, ⁸Error Estandar de la media

Se ha sugerido que un incremento de 3°C sobre la temperatura ambiente representa la producción de calor suficiente para que un ensilaje se clasifique como inestable bajo condiciones aeróbicas. En este experimento, incremento de tal magnitud se observaron después de 24 h en el ensilaje control y el de THO y aproximadamente a las 48 h en el ensilaje de THH (Figura 8).

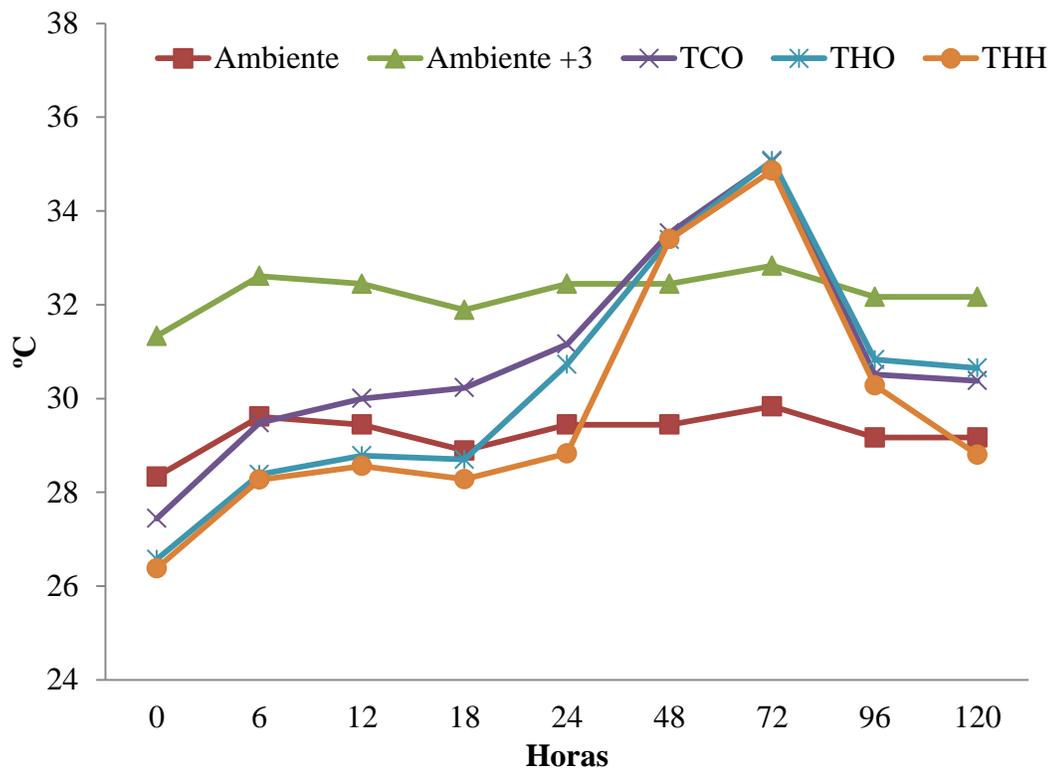


Figura 8. Temperatura observada durante el periodo de exposición aeróbica en ensilaje de maíz de los tratamientos experimentales

Al examinar la relación entre el largo de fermentación y el pH y la temperatura de los ensilajes expuestos al aire, se nota que a los días 15 y 30 hay indicios favorables al uso de los inóculos, pero posteriormente y hasta los 90 d de fermentación las tendencias son inconsistentes relativo el control (Cuadro 7).

El tratamiento (THH) con la adición del inóculo conteniendo una combinación de bacterias tipo homo- y heterofermentativas dió indicios de mejorar la estabilidad aeróbica del maíz bajo las condiciones de laboratorio imperantes, evidenciado por una menor temperatura durante los primeros 30 h de exposición al aire.

Cuadro 7. Efecto combinado promedio de largo de fermentación y tratamientos experimentales a través del largo de exposición aeróbica sobre el pH y la temperatura en ensilaje de maíz ²

Componente	LF Días	Tratamientos			EEM ⁴	Probabilidad		
		TCO ¹	THO ²	THH ³		TRT	LF	TRT*LF
pH	15	5.52 ^z	5.43 ^y	5.48 ^y	0.13	0.11	0.01	0.13
	30	5.75 ^z	5.46 ^y	5.46 ^y				
	58	5.32	5.42	5.44				
	90	5.24	4.87	5.33				
Temperatura (°C)	Días	TCO	THO	THH	EEM ³	TRT	LF	TRT*LF
	15	30.03 ^a	29.34 ^{ab}	28.69 ^b	4.46	0.01	0.01	0.03
	30	33.04 ^a	31.83 ^{ab}	30.48 ^b				
	58	29.70 ^a	29.38 ^{ab}	28.53 ^b				
90	30.53	30.48	30.74					

¹ Control, ²Ensilajes tratados con BPAL Homolácticas, ³Ensilaje tratado con BPAL Homo- y Heterolácticas,

⁴ Error estándar de la media, TRT=Tratamiento, LF=Largo de Fermentación, ^{a,b}Medias con diferentes letras en la misma fila difieren (P<0.05), ^{z,y}Medias con tendencias significativas (P<0.15)

5.2. Experimento 2

5.2.1. Composición Química

El maíz tuvo en promedio contenidos porcentuales de MS, 39.91; MO, 84.86; MI, 15.12; PB, 6.48; FDN, 65.95; FDA, 51.37 y HC, 14.58 (Cuadro 8). La composición química inicial del material vegetativo utilizado en este experimento coincide con la del maíz ensilado en el experimento previo en pH y las fracciones MS y PB, pero entre los componentes de pared celular presenta valores más altos de FDN y especialmente de FDA (Cuadro 2). Además, el alto nivel de MI indicaría contaminación con tierra al efectuar la cosecha mecánica.

Cuadro 8. Composición química inicial del maíz antes de ensilar¹

Componente	Media
pH	6.42
Fraccion Química (%)	
MS	39.91
MO ³	84.86
MI ³	15.14
PB ³	6.48
FDN ³	65.95
FDA ³	51.37
HC ^{2,3}	14.58

¹Media de tres repeticiones, ²Hemicelulosa=FDN-FDA, ³Base Seca

5.2.2. Características Fermentativas

El efecto principal de la adición o no del inóculo microbiano al ensilar el maíz (tratamientos experimentales) fue significativo ($P < 0.05$) sobre el pH y el producto de fermentación AP, mientras quedó justamente corto ($P < 0.06$) en el caso de AL. Los valores de pH y AP fueron menores y el de AL mayor con dicha adición (Cuadro 9). El ensilaje control

mostró doble el contenido de AB que el inoculado, pero esta diferencia no fue significativa ($P>0.05$) (Cuadro 9). Entre ambos tratamientos el contenido de AA difirió muy poco y la relación de $N-NH_3/N$ -total mostró mucha variabilidad analítica ($EEM=3.56\%$) (Cuadro 9). Las concentraciones de AP y AB fueron demasiado bajas para influenciar la calidad del ensilaje mientras la de AA fue de módica importancia. Los ensilajes inoculados con BPAL tipo homofermentativas o con estas en combinación con heterofermentativas tienden a mostrar una fermentación homoláctica, con mayores concentraciones de AL y menores de AA y pH más bajo respecto a ensilajes sin inóculos bacterianos (Muck y Kung, 2007; Holzer et al., 2003). La inoculación con BPAL tipo homofermentativas solas también ha resultado en ensilajes con menores contenidos de AA, AB y $N-NH_3$ en relación al N-Total (Oude Elferink et al., 2001).

Durante los días 7 al 45 del proceso fermentativo el pH fue consistente menor ($P<0.01$) en el ensilaje inoculado que en el control (Cuadro 10). La misma situación existió en la concentración de AL pero el efecto del tratamiento quedó justamente corto de la significación ($P<0.06$). Lo contrario sucedió en el caso de AA hasta el día 28 con mayores concentraciones en el ensilaje control, pero sorprendentemente a los 45 d subió súbitamente en el ensilaje inoculado hasta sobrepasar el control (1.45 vs 1.01 %).

Cuadro 9. Efecto principal de la aplicación o no de inóculo sobre las características fermentativas medias en ensilaje de maíz tropical

Componente ¹	Ensilaje del Tratamiento ⁴		EEM ⁵	P
	TCRL ²	THTF ³		
pH	4.92 ^a	4.58 ^b	0.02	0.01
Ácido láctico ⁶	1.29 ^b	1.64 ^a	0.22	0.06
Ácido acético ⁶	0.83	0.79	0.04	0.64
Ácido propiónico ⁶	0.06 ^a	0.02 ^b	0.01	0.04
Ácido butírico ⁶	0.10	0.05	0.01	0.22
NH3/N-Total ⁶	1.89	1.58	3.56	0.66

¹ Medias de 3 repeticiones, ²Control, ³Ensilaje inoculado con BPAL, ⁴Medias con diferentes letras en la misma fila difieren ($p < 0.05$), ⁵ Error standard de la media, ⁶Base Seca

Los resultados de varios estudios concuerdan en que la inoculación con una mezcla de BPAL homofermentativas (*L. plantarum* y *E. faecium*) y heterofermentativas (*L. brevis*) conduce a ensilajes con mayores concentraciones de AA respecto a ensilajes sin inocular. Esto se debe a la actividad de BPAL heterofermentativas que se caracterizan por utilizar AL como sustrato y producir AA (Kleinschmit y Kung, 2006; Adesogan et al., 2004; Driehuis et al., 2001). En el experimento presente se observó este fenómeno después del día 45 de fermentación, lo que podría ser indicativo de una mayor actividad de bacterias homofermentativas durante las etapas iniciales de la fermentación y subsecuentemente mayor actividad de las heterofermentativas en las etapas intermedias o finales.

Se ha observado que otros microorganismos tipo heterofermentativos (i.e. *L. buchneri*) también utilizan AL como sustrato para la producción de AA (Driehuis et al., 1999). En el caso presente la BPAL heterofermentativa en el inóculo utilizado fue *L. brevis*. Sería pertinente un

estudio de bacterias epifíticas para determinar si existe alguna capaz de utilizar el ácido láctico como sustrato durante el proceso de fermentación.

En el ensilaje control ocurrieron aumentos súbitos en los niveles de AP y AB a los 45 d de fermentación, mientras en el ensilaje inoculado no hubo aumento de AP y sólo un módico aumento de AB, lo que habrá contribuido a hacer significativa el efecto ($P < 0.04$) de tratamiento para AP pero no para AB y tampoco fue suficiente para que se verificara interacciones significativas de tratamiento por largo de fermentación. En ambos tratamientos los ensilajes cumplieron con los parámetros recomendados para considerarse como de buena calidad (AP y AB $< 1\%$, N-NH₃/N-Total $< 8\%$, BS). Contrario a lo observado en el primer experimento de este proyecto, en el caso presente la inoculación con BPAL logró mejorar las características fermentativas del ensilaje resultante evidenciado por una mayor acidez y contenido de AL y menor contenido de AA.

Los microorganismo utilizado en los inóculos fueron: en Experimento 1, (*L. plantarum*, *L. buchneri* y *E. faecium*), y en Experimento 2 (*L. plantarum*, *L. brevis* y *E. faecium*); las poblaciones de BPAL inoculadas (UFC) en los dos sucesivos casos fueron 10^6 vs 10^{10} . Se incluyó cuatro largos de fermentación en Expto 1 (15, 30, 57 y 90 d) pero uno solo (45 d) en Expto. 2. La edad y composición química del forraje el área geográfica de origen del forraje (Isabela y Lajas) así como diferencias en los microorganismos epifíticos presentes, podrían ser otros factores que influenciaron los resultados.

Cuadro 10. Efectos combinados de largo de fermentación y aplicación de inóculo sobre la concentración de productos de fermentación y pH en ensilaje de maíz tropical¹

Componente	LF Días	Tratamientos		EEM ⁴	Probabilidad		
		TCRL ²	THTF ³		TRT	D	TRT*LF
pH	0	6.39	6.46	0.02	0.01	0.01	0.02
	7	4.70 ^a	4.32 ^b				
	13	4.47 ^a	4.07 ^b				
	28	4.35 ^a	4.00 ^b				
	45	4.67 ^a	4.07 ^b				
Ácido láctico (%)	0	0.11	0.11	0.22	0.06	0.01	0.34
	7	1.48	1.66				
	13	1.38	2.15				
	28	2.20	2.48				
	45	1.31	2.13				
Ácido acético (%)	0	0.30	0.26	0.04	0.64	0.01	0.07
	7	0.84 ^c	0.70 ^d				
	13	0.94 ^c	0.68 ^d				
	28	1.04 ^c	0.88 ^d				
	45	1.01 ^d	1.45 ^c				
Ácido propiónico (%)	0	0	0	0.01	0.04	0.05	0.23
	7	0.03	0.02				
	13	0.04	0.03				
	28	0.07	0.02				
	45	0.15	0.03				
Ácido butírico (%)	0	0	0	0.01	0.22	0.02	0.16
	7	0.02	0.023				
	13	0.02	0.07				
	28	0.10	0.05				
	45	0.37	0.09				
N-NH ₃ / N-Total (%)	0	0	ND	3.56	0.66	0.02	0.75
	7	1.14	ND				
	13	3.71	2.26				
	28	1.05	1.84				
	45	3.29	3.83				

¹ Expresado en base seca, ²Control, ³Ensilaje inoculado con BPAL, ⁴Error estándar de la media, ^{a,b}Medias con diferentes letras en la misma fila difieren (P<0.05), ^{c,d} Medias con tendencias significativas (P<0.10)

5.2.3. Consumo Voluntario y Digestibilidad de Nutrientes

Se estudió el efecto de incluir ensilaje de maíz producido con o sin adición de inóculo en combinación con HGT y un pequeño suplemento de harina de soya en dietas para ovinos en términos de consumo voluntario y digestibilidad de la MS, PB y FDN. Cada forraje, ensilaje y heno, constituyó el 50 % BS del forraje total en ambas dietas experimentales. El contenido inicial de las citadas fracciones químicas de los dos ensilajes de maíz del HGT y de la harina de soya utilizados en la prueba se presenta en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Composición química de heno de gramíneas y ensilaje de maíz con y sin inóculo microbiano ofrecidos a los corderos

Componente (%)	MS	PB ¹	FDN ¹
Heno de Gramíneas Tropicales	93.05	4.32	72.58
Ensilaje sin inóculo	38.68	7.58	60.96
Ensilaje inoculado	39.66	8.16	63.05
Harina de Soya	90.50	53.40	11.00

¹Base seca

Se observó un consumo voluntario total (CVT) numéricamente mayor de la dieta sin el ensilaje inoculado que con el ensilaje de maíz inoculado (553.2 vs 512.1 g MS/d; Cuadro 12). Los animales ofrecidos la dieta control, optaron por consumir más heno que ensilaje sin inocular (267.6 vs 223.3 g MS/d) mientras los bajo el otro régimen dietético prefirieron consumir más ensilaje inoculado que heno (230.6 vs 218.2). Sin embargo, el CVEin fue de sólo 8.3 g MS/d, mayor que el CVEct.

Estos resultados sugieren una mayor aceptación de los ovinos por el ensilaje tratado con el inóculo microbiano que por el ensilaje sin tratar. El consumo voluntario animal está influenciado por diversos factores, además de las características de sabor y olor de los alimentos

(Dulphy y Van Os, 1996). Por lo tanto es especulativo sugerir que en este experimento el mayor contenido de AL en el ensilaje inoculado puede haber influenciado positivamente en el consumo del ensilaje.

Según Dulphy y Van Os (1996) ciertos productos de fermentación presentes en alta concentración, tales como NH_3 , ácido acético y acidez total, desmejoran la palatabilidad. Demarquilly (1994) plantea que los ovinos no son sensibles a la acidez del ensilaje, lo que sería contrario a la situación en los vacunos donde afecta el consumo (Mohammadzadeh et al., 2011). No obstante, generalmente los rumiantes tienden a consumir menos de ensilaje que forraje en forma fresca o seca. McDonald et al. (2002) fijaron esta diferencia en un 30 %.

En este experimento, la relación consumo ensilaje/ensilaje ofrecido y la relación ensilaje consumido/consumo total fueron numéricamente mayores en THTF que en el control. El mayor consumo de ensilaje por ovinos en el THTF se asoció a una relación de consumo heno/heno ofrecido menor por 12.92 unidades porcentuales que la del control y una relación heno consumido/consumo total 5.76 unidades menor. Estos resultados también apoyan la sugerencia de un efecto beneficioso de la inoculación sobre el CV del ensilaje de maíz.

El mayor consumo de MS procedente de ensilaje por los ovinos del THTF resultó en un mayor ($P < 0.05$) consumo de PB y una mayor ($P < 0.05$) relación consumo de PB del ensilaje sobre consumo de PB total que en animales alimentados con la dieta incluyendo el ensilaje control. Al contrario del consumo de PB, el de FDN fue mayor en ovinos del TCRL. Numerosos estudios relevan que la digestibilidad de ensilajes de maíz puede variar grandemente por diversos factores, tales como genética de la planta, condiciones ambientales, y el manejo del forraje antes y después de cosechado (Allen, 2009; Johnson et al., 2003; Coor et al., 1997). En algunos estudios la inoculación bacteriana ha afectado positivamente la digestibilidad. Aksu et

al., (2004), usaron inóculo de microbios homo- (i.e. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *P. pentosaceus*) y heterofermentativos (i.e. *L. brevis*, *L. buchneri*) con ensilaje de maíz y obtuvieron un aumento de 8.8 unidades porcentuales (59.7 vs 68.5) en la digestibilidad de MS y 2.7 unidades (63.4 vs 66.1) en la de FDN usando ovinos de la raza Morkaraman.

En el presente estudio, la adición del inóculo microbiano en ensilaje de maíz, que se combinó con HGT, afectó positivamente ($P < 0.005$) la digestibilidad aparente de la PB en relación a la dieta control (78.4 vs 72.2 %) con un margen de 6.19 unidades porcentuales, pero resultó en una digestibilidad un poco menor de la MS (64.1 vs 65.7%), aunque poco mayor en cuanto a la FDN (60.0 vs 58.4%).

Cuadro 12. Consumo diario y digestibilidad aparente de dietas incluyendo ensilaje de maíz tropical con y sin inóculo de BPAL

Criterios de respuesta	TCRL ¹	THTF ²	EEM	P
<u>Consumo MS (g/d)</u>				
Heno	267.6 ^a	218.2 ^b	4.92	0.005
Ensilaje	222.3	230.6	1.02	0.706
Harina de Soya	63.3	63.3		
Total	553.2	512.1	3.2	0.234
<u>Razón (%)</u>				
Ensilaje consumido/Ensilaje ofrecido	76.00	82.42	1.91	0.283
Heno consumido/Heno ofrecido	91.5	78.58	2.63	0.083
Ensilaje consumido/ Consumo total	40.18	45.03	1.02	0.076
Heno consumido/ Consumo total	48.37 ^a	42.61 ^b	0.58	0.023
Consumo total / PV	2.75	2.69	1.11	0.545
<u>Consumo PB (g/d)</u>				
Heno	12.00 ^a	10.43 ^b	0.84	0.001
Ensilaje	16.35 ^b	20.88 ^a	2.01	0.001
Harina de soya	33.82	33.82		
Total	62.07 ^b	65.13 ^a	1.15	0.054
<u>Razón (%)</u>				
Consumo PB ensilaje/Consumo total PB	26.34 ^b	32.06 ^a	1.12	0.001
Consumo PB heno/Consumo total PB	19.33 ^a	16.01 ^b	0.89	0.001
<u>Consumo FDN (g/d)</u>				
Heno	192.0 ^a	156.3 ^b	2.49	0.001
Ensilaje	127.0	137.7	1.43	0.245
Harina de soya	7.0	7.0		
Total	325.9	301.1	0.94	0.119
<u>Razón (%)</u>				
Consumo FDN ensilaje/Consumo FDN total	38.97 ^b	45.73 ^a	0.89	0.001
Consumo FDN heno/Consumo FDN total	58.91 ^a	51.91 ^b	0.43	0.001
<u>Heno</u>				
<u>Digestibilidad de la dieta (g/100g)</u>				
MS	65.7	64.11	0.58	0.08
PB	72.22 ^b	78.41 ^a	0.43	0.002
FDN	58.42	60.02	0.91	0.967

¹ Dieta Control, ²Dieta que incluye ensilaje inculado con BPAL, ^{a,b} Medias con diferentes letras en la misma fila tienen difieren (P<0.05)

5.2.4. Estabilidad Aeróbica

La EA es una característica muy importante ya que determina la vida útil del ensilaje una vez abierto el silo. El clima tropical y húmedo de Puerto Rico, favorece la proliferación y actividad metabólica de microorganismos asociados con el deterioro aeróbico de los ensilajes. La inestabilidad de un ensilaje resulta del metabolismo de carbohidratos residuales y productos de fermentación que se refleja en aumentos en la temperatura y el pH (McDonald et al., 1991). Según Ashbell (1999), dicho proceso se acelera en los ambientes tropicales cálidos y húmedos.

En el presente experimento se observó un pH más bajo por 1.32 unidades y una temperatura menor ($P<0.05$) por $2.07\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el ensilaje THTF luego de ser expuesto a condiciones aeróbicas que en el ensilaje control (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto principal de la aplicación de inóculo microbiano sobre el pH y temperatura durante la exposición aeróbica de ensilaje de maíz

Componente ^{1,5}	TCRL ²	THTF ³	EEM ⁴
pH	6.65 ^a	5.33 ^b	0.36
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	34.13 ^a	32.06 ^b	4.38

¹Media de 3 repeticiones, ²Control, ³Ensilaje inoculado BPAL, ⁴Error estandar de la media, ⁵Medias con diferentes letras en la misma fila difieren ($P<0.05$)

También se detectó una interacción significativa ($P<0.004$) entre el tratamiento experimental y los días de exposición al aire referente al pH del ensilaje (Cuadro 14). El pH aumentó ($P<0.05$) a medida se alargó el tiempo de exposición al aire en ambos tratamientos pero dicho aumento fue escalonado en TCRL mientras ocurrió casi todo entre días 1 y 3 en THTF. La diferencia entre tratamientos favoreció ($P<0.05$) al THTF a los días 0 y 1 pero ya no a los 3 días cuando se había reducido a 0.25 unidades. La mayor acidez observada en el ensilaje inoculado

después de un día de exposición, es cónsona con el mayor contenido de AA del ensilaje al momento de exponerlo al aire. Se ha demostrado que el AA posee características antimicóticas que evitan o atrasan el deterioro de alimentos fermentados una vez expuestos a condiciones aeróbicas (Danner et al., 2003).

Cuadro 14. Efectos combinados del periodo de exposición aeróbica y la aplicación de inóculos microbianos sobre el pH y temperatura de ensilaje de maíz

Componente ¹	D ⁵	Tratamientos ⁷		EEM ⁶	Probabilidad			
		TCRL ²	THTF ³		TRT ⁴	D	TRT*D	
pH	0	5.27 ^a	4.11 ^b	0.358	<0.0001	<0.0001	0.004	
	1	6.88 ^a	4.33 ^b					
	3	7.80	7.55					
Temperatura (°C)	Horas	TCRL	THTF	AMB	EEM	TRT	H	TRT*H
	0	27.25	27.25	26.67	4.38	0.001	0.001	0.486
	2	30.00	27.53	26.67				
	4	29.88	26.83	26.67				
	8	31.95	28.73	28.89				
	14	33.60	29.70	30.00				
	20	35.58	32.20	29.44				
	26	35.43	32.90	28.33				
	72	37.90	36.68	29.17				
	90	40.83	39.60	29.24				
96	38.90	39.15	30.00					

¹ Media de 3 repeticiones, ²Control, ³Ensilaje inoculado con BPAL, ⁴Tratamiento, ⁵Día, ⁶Error estándar de la media, ⁷Medias con diferentes letras en la misma fila difieren (P<0.05)

En cuanto a los efectos del largo de exposición aeróbica sobre la temperatura de los ensilajes, el control sin inocular ya habían alcanzaron un aumento en temperatura de 3°C o más respecto a la temperatura ambiental a las 4 h de exposición, mientras que en el THTF dicha magnitud de aumento no se observó hasta después de 26 h (Cuadro 14). El ensilaje control mostró un aumento de 2.75 °C durante las primeras 2 horas de exposición y luego su temperatura ascendió gradual y casi uniformemente a través del periodo aeróbico al menos hasta las 90 h,

cuando alcanzó su máximo de 40.83 °C. En el ensilaje con inóculo de BPAL también se observó un incremento progresivo de temperatura que fue más lento hasta las 26 h y luego rápido hasta un máximo de 39.60 °C a los 90 h. A sus puntos máximos los ensilajes TCRL y THTF excedieron a la temperatura ambiental por 11.59 y 10.36 °C respectivamente, lo que constituye marcados calentamientos. Los efectos de tratamiento experimental y del largo de exposición aeróbica sobre la temperatura fueron significativas ($P < 0.001$) pero no hubo interacción entre estos factores (Cuadro 14).

6.0. Conclusiones

Experimento 1

- La adición de dos inóculos comerciales de BPAL, uno de tipo homofermentativo y el otro de una combinación de tipos homo- y heterofermentativos, a razón de 10^6 ufc/g de material fresco al ensilar maíz en microsilos, no mejoró las características fermentativas del ensilaje resultante en el clima tropical local bajo condiciones de laboratorio.
- El uso de dichos inóculos mejoró ligeramente la estabilidad aeróbica de los resultantes ensilajes, pero se obtuvo mayor efecto con la combinación de los dos tipos de BPAL.

Experimento 2

- El tratamiento de maíz ensilado en bolsas plásticas con un inóculo de BPAL tipo homo- y heterofermentativos, a razón de 10^{10} ufc/g de material fresco, mejoró las características fermentativas del ensilaje resultante.
- Al comparar dos dietas experimentales para corderos compuestas de partes iguales (BS) de HGT y ensilaje de maíz, con o sin la adición del aludido inóculo, más un suplemento de harina de soya, hubo levemente mayor consumo del ensilaje con inóculo, pero el consumo de HGT y de forraje total fue mayor en el caso de la dieta control.
- Maíz fermentado en bolsas plásticas con adición de la combinación de BPAL citada mostró mejor estabilidad al exponerse a condiciones aeróbicas que el material fermentado sin inoculación de BPAL.

7.0. Referencias

- Adesogan, A. T., N. Krueger, M. B. Salawu, D. B. Dean, and C. R. Staples. 2004. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of Bermuda grass. *J. Dairy Sci.* 87:3407-3416.
- Andrea, J.G., C.W. Hunt, G.T. Pritchard, L.R. Kennington, J.H. Harrison, W. Kezar, and W. Mahanna. 2001. Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing of corn silages on intake and digestibility by beef cattle. *J. Anim. Sci.* 79:2268-2275.
- Aguilera, R., G. Llamas y A. Shimada. 1992. Valor nutritivo del ensilaje de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) CV Taiwan, adicionado con un inhibidor y dos estimulantes de la fermentación. *Tec. Pec.-México* 30(3):196-207.
- Aksu, T., E. Baytok, and D. Bolat. 2004. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. *Small Rum. Res.*55:249-252.
- Ashbell, G., Z.G.Weinberg, Y. Hen, and I. Filya. 2002. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. *J. Ind. Microb. Biotech.*28:261-263.
- Allen, M. 2009. Maximizing digestible intake of corn silage-based diets: Part 1. Michigan Dairy Review. Michigan State University, East Lansing, MI. July Issue.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15thEdition. Arlington, VA.
- Arias Carrasquillo, F. 1998. Características fermentativas y estabilidad aeróbica de dos variedades de maíz tropical y hierba guinea ensilada a diferentes estados de madurez. Tesis Maestría, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- Baumont, R., S. Prache, M. Meuret and P. Morhand Fehr. 2000. How forage characteristics influence behaviour and intake in small ruminants: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 61(1); 15-28.
- Beck, T. 1978. The microbiology of silage fermentation. In: *Fermentation of Silage-a Review*. M. E. McCullough (ed) National Feed Ingredients Association. Iowa. pp. 61-115.
- Black, R.D., D.S. McVey, F.W. Oehme. 1992. Immunotoxicity in the bovine animal: a review. *Vet. Human Toxicol.* 34 (Suppl. 5): 438-442.
- Charley, R. 2006. Key Silage Management Topics. Lallemand Animal Nutrition North America. Milwaukee, WI p. 44-51
- Coor, J.G., K.A. Albrecht, and E. J. Bures. 1997. Ear-fill effect on yield and quality of silage corn. *Crop Sci.* 37; 243-247.

- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562-597.
- Demarquilly, C. 1994. Facteurs de variation de la valeur nutritive du maïs ensilage. *INRA Prod Anim.* 7:177-189.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87:583-594.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and P. G. Van Wikselaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.* 56:330-343.
- Dulphy, J.P. and M. Van Os. 1996. Control of voluntary intake of precision-chopped silages by ruminants: a review. *Reprod Nutr. Dev.* 36:113-135.
- Dulphy J.P, et B. Michalet-Doreau. 1981. Prevision de l'ingestibilite des ensilages d'herbe. In: C Demarquilly (ed) Prevision de la valeur nutritive des aliments des ruminants, INRA Publications, Versailles, 169-188.
- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818-826.
- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradation of maize silage. *J. Appl. Microbiol.* 101:1216-1223.
- González, G. and A.A. Rodríguez. 2003. Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability, and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. *J. Dairy Sci.* 86:926-933.
- Hoffman, P.C. and S. M. Ocker. 1997. Quantification of milk yield losses associated with feeding aerobically unstable high moisture corn. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl. 1) :234. (Abstr.)
- Holzer, M, E. Mayrhuber, H. Danner and R. Braun. (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotech.* 21(6): 282 - 287.
- Hu, W., R. J. Schmidt, E. E. McDonell, C. M. Klingerman, and L. Kung Jr. 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *J. Dairy Sci.* 92: 3907-3914.

- Huisden, C. M., A. T. Adesogan, S. C. Kim, and T. Ososanya. 2009. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92:690-697.
- Illius, A.W. and N.S. Jessop. 1996. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. *J. Anim. Sci.*, 74: 3052-3062.
- Jatkauskas, J., V. Vrotniakiene and D. Urbsiene. 2008. Effects of a bacterial mix inoculant on grass-legume silage fermentation and nutrition value for the dairy cow. *Anim. Husb.: Scientific Articles* 52:51-59.
- Johnson, L. M., J. H. Harrison, D. Davidson, W. C. Mahanna, and K. Shinnars. 2003. Corn silage management: Effect of hybrid, chop length, and mechanical processing on digestion and energy content. *J. Dairy. Sci.* 86:208–231.
- Kang, T. W., A. T. Adesogan, S. C. Kim, and S. S. Lee. 2009. Effects of an esterase-producing inoculant on the fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92:732-738.
- Kennington, L.R., C.W. Hunt, J.I. Szasz, A.V. Grove, and W. Kezar. 2005. Effect of cutting height and genetics on composition, intake, and digestibility of corn silage by beef heifers. *J. Anim. Sci.*83:1445-1454.
- Kleinschmit, D.H, R.J. Schmit, and L. Kung, Jr. 2005. The effect of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 88:2130-2139.
- Kleinschmit, D. H., and L. Kung, Jr. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J. Dairy Sci.* 89:4005–4013.
- Kruse, S., A. Herrmann, A. Kornher, and F. Taube. 2008. Genotype and environmental variation in water soluble carbohydrate content of silage maize. *Field Crop Res.*106:191-202.
- Kung, L., Jr. 2000. Direct-fed microbial, enzyme and forage additive compendium. Miller Publishing Co., Minnetonka, MN.
- Kung, L., Jr. 2005. Aerobic stability of silages. *Proc. of the University of Delaware Conference on Silage for Dairy Farms.* Harrisburg, PA.
- Kung, L., Jr. and N. K. Rajit. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* 84:1149-1155.
- Kung, L., Jr., C. C. Taylor, M. P. Lynch, and J. M. Neylon. 2003. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:336-343.

- Marcinakova, M., A. Laukova, M. Simonova, V. Stropfova, B. Korenekova, and P. Nad. 2008. A new probiotic and bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EF9296 and its use in grass ensiling. Czech. J. Anim. Sci. 53:336-345.
- Martinez Fleitas, J. 1998. Efecto de la aplicación de aditivos comerciales sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de forrajes ensilados en ambientes tropicales. Tesis Maestría, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. pp15; 28-31.
- McDonald, P., A.R. Henderson, and S.J. Heron. 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd ed. ChalcombePubl: Cambriam Printers Ltd. Aberystwyth, U.K. 19-105 pp.
- McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D., Greenhalgh, and C.A. Morgan. 2002. Animal Nutrition, 6th ed. Prentice Hall Publications. Marlow, UK.
- McEniry, J., P. O. Kiely, N. J. W Clipson, P. D. Forristal, and E. M. Doyle. 2008. The microbiological and chemical composition of silage over the course of fermentation in round bales relative to that of silage made from unchopped and precision-chopped herbage in laboratory silos. Grass Forage Sci.. 63:407-420.
- Mohammadzadeh, H., M. Khorvash, G.R. Ghorbani, and W.Z. Yang. 2011. Effect of a dual purpose bacterial inoculant on the fermentation characteristics of high moisture maize silage and dairy cattle performance. S. Afri.J. Anim. Sci. 41:368-376.
- Muck, R. E. 2004. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. Trans. ASAE 47:1011-1016.
- Muck, R.E.. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. J. Dairy Sci. 71:2992-3002
- Muck, R. E. and L. Kung Jr. 2007. Silage production. In Forages: The Science of Grassland Agriculture. Barnes, C., J. Nelson, K. J. Moore, and M. Collins, (eds.)Vol. II. 6th ed. R. F. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp: 617–633.
- Muck, R. E. and L. Kung, Jr. 1997. Effects of silage additives on ensiling. In Silage: Field to Feedbunk.BRAES-99.NRAES, Ithaca, NY. pp: 187-199
- Muck, R.E. and R.E. Pitt. 1994. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. Trans. ASAE 37:735-743.
- Nichols, S. W, M. A. Froetschel, H.E. Amos, and L.O. Ely. 1998. Effect of fiber from tropical corn and forage sorghum silages on intake, digestion, and performance of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81:2383-2393.

- Nishino, N., H. Wada, M. Yoshida, and H. Shiota. 2004. Microbial count, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 87:2563-2570.
- Ostling, C.E. and S.E. Lindgreen. 1995. Influence of Enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silage. *Grass Forage Sci.* 50:41-47.
- Ostling, C.E. and S.E. Lindgreen. 1991. Bacteria in manure and on NPK fertilized silage crops. *J. Sci. Food Agric.* 55:579.
- Oude Elferink, S. J., S.F. Drieguis, J.C. Gottschal, and S.F. Spoelstra. 1999. Silage fermentation process and their manipulation. FAO Electronic conference on tropical feeds and feeding system, paper 2.
- Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:125–132.
- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis., S. J. W. H. Oude Elferink, and S.F. Spoelstra. 2003. Microbiology of ensiling. In D. R. Buxton, R. E. Muck, & J. H. Harrison (Eds.), *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy. Madison, WI: pp. 31–93
- Pasebani, M., H. Yaakub, K. Sijam, and A.R. Alimon. 2010. Isolation and identification of epiphytic lactic acid bacteria from guinea grass (*Penicum maximum*). *Amer. J. Anim. Vet. Sci.* 5:146-150.
- Paul Ross, R., S. Morgan, and C. Hill. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3-16.
- Phipps, R.H., A.B. McAllan, and R.F. Weller. 1984. The development of plant components in isogenic sterile and fertile forage maize and their effects on carbohydrates composition, nutritive value, in vitro digestibility values and animal performance with fresh and ensiled crops. *J. Agric. Sci.* 102: 443-453.
- Phipps, R.H. and R.F. Weller. 1979. The development of plant components and their effect on the composition of fresh and ensiled forage maize. I. The accumulation of dry matter, chemical composition and nutritive value of fresh maize. *J. Agric. Sci.* 92:471-483.
- Playne, M.J. and P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17 (6):264-268.
- Prieto-Prieto, R. J. 2007. Efecto del manejo de nitrógeno sobre características agronómicas, composición química y fermentativa de híbridos de maíz a diferentes edades de corte. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

- Rajit, N. K. and L. Kung, Jr. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservation on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 83:526-535.
- Regan, C. 2000. Making round bale silage. Northern Territory of Australia Department of Primary Industry and Fisheries. Agnote. No. 787, E68.
- Rodriguez, A. A. 1996. Studies on the efficacy of a homofermentative lactic acid producing bacterial inoculant and commercial plant cell wall-degrading enzyme mixtures to enhance the fermentation characteristics and aerobic stability of forages ensiled in temperate and tropical environments. Ph.D. Dissertation. Michigan State University. East Lansing, MI. 351 pp.
- Rooke, J.A. and R.D. Hatfield. 2003. Biochemistry of Ensiling. In: D.R. Buxton, R.E. Muck and J.H. Harrison (eds) *Silage Science and Technology*. Agron. Monogr. 42. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp. 95–139.
- Rosario, C. 2012. Efecto de la aplicación de inóculos microbianos sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario de ensilaje de gramíneas tropicales naturalizadas. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- Ruiz, M. y A. Ruiz. 1990. Nutrición de Rumiantes: Guía metodológica de investigación. Edit. ALPA, IICA, RISPAL. Costa Rica. 334 p.
- Sandoval Centeno, B. 2007. Características agronómicas y nutricionales de asociaciones de gramíneas y leguminosas tropicales. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- SAS Institute. 2004. *SAS/STAT 9.1 User's Guide*.: SAS Institute, Inc. Cary (NC)
- Schmidt, R. J. and L. Kung, Jr. 2010. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silage made at different locations. *J. Dairy Sci.* 93:1616-1624.
- Spiraleri, R. F., L. E. Sollenberger, C. R. Staples, and S. C. Schank. 1995. Harvest management effects on ensiling characteristics and silage nutritive value of seeded *Pennisetum hexaploid* hybrids. *Postharvest Biol. Technol.* 5:353.
- Tabacco, E., F. Right, A. Quarantelli, and G. Borreani. 2010. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. *J. Dairy Sci.* 94:1409-1419.

Tjardes, K.E., D. D. Buskirk, M. S. Allen, R.J. Tempelman, L.D. Bourquin and S. R. Rust. 2002. Neutral detergent fiber concentration in corn silage influences dry matter intake, diet digestibility, and performance of Angus and Holstein steers. *J. Anim. Sci.* 80::841-846.

Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd ed.. Comstock Publishing Assoc., Ithaca, New York.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:473-481.

Weinberg, Z.G., O. Shatz, Y. Chen, E. Yosef, M. Nikbahat, D. Ben-Ghendalia, and J. Miron. 2007. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. *J. Dairy Sci.* 90:4754-4762.

Weinberg, Z.G., G. Szakacs, G. Asbell, and Y. Hen. 2001. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. *J. Appl. Microbiol.* 90:561-566.

Wessels, S., L. Axelsson, E. B. Hansen, L. D. Vuyst, S. Laulund, L. Lahteenmaki, S. Lindgren, B. Mollet, S. Salminen, and A. Wright. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulations. *Food Sci. Tech.* 15:498-505.

Whitlock, L.A., T. J. Wistuba, M. K. Seifers, R. V. Pope, and K. K. Bolsen. 2000. Effect of level of surface spoiled silage on the nutritive value of corn silage diets. *J. Dairy Sci.* 83 (Suppl. 1): 110. (Abstr.)

Wohlt, J.E. 1989. Use of a silage inoculant to improve feeding stability and intake of a corn silage-grain diet. *J. Dairy Sci.* 72; 545-551.

Wolf, D. P., J. G. Coor, K.A. Albrecht, D. J. Undersander, and P. R. Carter. 1993. Forage quality of maize genotypes selected for extreme fiber concentrations. *Crop Sci.* 33:1353-1359.