

Efecto de la aplicación de inóculos microbianos sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario de ensilaje de gramíneas tropicales naturalizadas

Por

Carlos A. Rosario López

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
2012

Aprobado por:

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

Fecha

Paul F. Randel Følling, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Esbal Jiménez Cabán, Ph. D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

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

Fecha

Aristides Armstrong, M.S.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

ABSTRACT

Two experiments were conducted to determine the effects of an additive containing two different microbial inoculants of homo-fermentative and hetero-fermentative lactic acid-producing bacteria (LAPB), on the fermentation characteristics, aerobic stability (AS), and intake by lambs of native tropical grasses (NTG). Both experiments included an “*in vitro*” and “*in vivo*” phase. Prior to ensiling, vegetative material was treated or not with the inoculants, applied at 10^6 cfu/g of fresh material for Commercial Inoculant 1 and 10^{10} cfu/g of fresh material for Commercial Inoculant 2. To determine fermentation characteristics, treatments were applied to weighted portions of NTG, manually mixed, and packed into PVC laboratory silos. Silages from each treatment were analyzed at seven ensiling periods (0, 4, 7, 14, 21, 28, and 35 days) to determine pH and fermentation products (organic acids and $\text{NH}_3\text{-N}$). For AS determination, triplicate silos from each treatment were emptied after 35 d of ensiling, placed into styrofoam containers lined with plastic bags, and exposed to air during 5 days. Temperature was monitored every six hours during the five days, by means of thermometers embedded in the surface of the expose silage and pH was determined after 0, 1, 3, and 5 d of aerobic exposure. To determine voluntary intake, NTG were fermented with or without the inoculant of LAPB during 35 days in 55 gallons capacity plastic bags. For each “*in vivo*” trial, six meat-type crossbred sheep were used, three fed each of two experimental diets, during 5 days. The diets had in common 50% tropical grass hay and 50% NTG fermented with or without with the LAPB and were offered daily at 3% dry matter basis (DMB) of body weight.

Experiment 1; the pH of the NTG decreased to final values between 4.38 to 4.39 in the two treatments, thus approaching the ideal level of 4.2 characteristic of a quality silage. Of the organic acids, lactic acid (LA) was the only one that showed initially a significant difference in

favor of the control treatment, then descended to final concentrations of less than 0.15% on the DMB ($P < 0.05$); NH_3 concentration as well as the ratio ammonia nitrogen/total nitrogen ($\text{N-NH}_3/\text{N-Total}$) remained at very low levels, indicative of little proteolysis. Temperature of the ensiled NTG in AS test, showed minimal increases in both treatments. This indicates a good resistance to aerobic spoilage. However, after the third day of exposure to air, the pH was greater ($P < 0.05$) for LAPB treatment, when compared with the control (4.39 vs. 4.52). Silage dry matter (DM) intake was greater ($P > 0.05$) in lambs fed NTG inoculated silage than in those receiving the control silage without inoculant (495.2 vs. 316.9 g / d), as was total DM intake (1059 vs. 905 g / d).

Experiment 2; silage without inoculant of LAPB, generally showed numerically greater ($P > 0.05$) concentrations of the organic acids analyzed, its pH was higher ($P < 0.05$) at each observation interval (final values, 5.29 vs. 4.77). Concentrations of NH_3 and $\text{N-NH}_3/\text{N-Total}$ ratio fluctuated without significance difference between treatments. In the AS test, the inoculated, silage was better by the criterion of pH ($P < 0.05$), values at 5 days of exposure being 5.32 vs. 5.59, but not with regard to temperature (27.41 vs. 27.22 °C). Lambs fed NTG silage without inoculant consumed numerically more silage DM (525.3 vs. 435.3 g / d) and total DM (1172 vs. 1063 g / d).

The addition of neither of the two inoculants of LAPB, achieved great improvement in the fermentation characteristics of NTG, which proved acceptable in control silages. In both experiments, silage with and without inoculants were stable during 5 days under aerobic conditions. There was a positive effect of inoculation with Commercial Inoculant 1 on voluntary intake, in the first experiment but not with the Commercial Inoculant 2 in the second trail.

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos para determinar el efecto de la aplicación de dos diferentes inóculos de bacterias productoras de ácido láctico (BPAL), homofermentativas y heterofermentativas, sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica (EA) y consumo voluntario (CV) de ensilaje de gramíneas tropicales naturalizadas (GTN). Ambos experimentos, incluyeron una fase “*in vitro*” y otra “*in vivo*”. Antes de ensilarse el material vegetativo se le trató o no con el inóculo correspondiente, aplicado a razón de 10^6 ufc/g de materia fresca para el Inóculo Comercial 1 y 10^{10} ufc/g de materia fresca para el Inóculo Comercial 2. Para determinar las características fermentativas, se aplicaron los inóculos a porciones pesadas de GTN, manualmente mezcladas, y se envasaron en silos PVC de laboratorio. Se analizaron ensilajes de cada tratamiento luego de siete períodos de fermentación (0, 4, 7, 14, 21, 28, y 35 días) para determinar pH y los productos de fermentación (ácidos orgánicos y amoníaco). Para la determinación de la EA, se abrieron silos por triplicado por cada tratamiento después de 35 días de ensilamiento, se colocaron muestras de ensilaje en recipientes de poliestireno envueltos parcialmente con bolsas de plástico y se expusieron al aire durante 5 días. Se realizó lectura de la temperatura cada seis horas durante los cinco días, tomando la lectura de la temperatura con termómetros incrustados en la superficie del ensilaje expuesto, y el pH se determinó después de 0, 1, 3, y 5 días de exposición al aire. Para uso en las pruebas de CV, las GTN fueron fermentadas, con o sin el inóculo de BPAL, correspondiente durante 35 días en bolsas de plástico de 55 galones de capacidad. Para cada prueba se alimentaron seis ovinos criollos tipo carne, tres de ellos con cada una de las dos dietas experimentales, durante 5 días. Las dietas tenían en común 50% de heno de GTN y 50% de GTN fermentada con o sin adición de BPAL, y se ofrecieron diariamente a 3% del peso vivo en base seca (PV/BS).

Experimento 1; el pH de la GTN descendió a valores finales entre 4.38 hasta 4.39 en los dos tratamientos; acercándose al nivel ideal de 4.2, que se procura en un ensilaje de calidad. De los ácidos orgánicos, el láctico (AL) fue el único cuyo contenido demostró inicialmente una diferencia a favor del tratamiento control, descendiendo luego a bajos niveles finales menores de 0.15% en BS ($P < 0.05$). La concentración de NH_3 , así como la relación nitrógeno amoniacal/nitrógeno total ($\text{N-NH}_3/\text{N-Total}$) siempre se mantuvo a niveles bajos, indicativo de proteólisis baja. La temperatura de las GTN ensiladas en la prueba de EA mostró mínimos aumentos en ambos tratamientos. Esto indica una buena resistencia al deterioro aeróbico. Sin embargo, después del tercer día de exposición al aire, el pH fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento con BPAL, al comparar con el control (4.39 vs. 4.52). El consumo de ensilaje (CE) fue numéricamente mayor ($P > 0.05$) en los ovinos alimentados con ensilaje de GTN inoculado al comparar con los que recibieron el ensilaje control sin inóculo (495.2 vs. 316.9 gMS/d), y así también el consumo de MS total (1059 vs. 905 g/d).

Experimento 2; el ensilaje sin inóculo de BPAL se obtuvo en mayores ($P > 0.05$) concentraciones en los ácidos orgánicos analizados, pero su pH fue mayor ($P < 0.05$) a cada uno de los intervalos de observación (valores finales, 5.29 vs 4.77). La concentración de NH_3 y la proporción de $\text{N-NH}_3/\text{N-Total}$ fluctuaron pero sin subir a niveles de importancia. En la prueba de EA, el ensilaje con inóculo tuvo efecto positivo en el pH ($P < 0.05$) a los 5 días de exposición (5.32 vs. 5.59), pero no así en la de temperatura (27.41 vs. 27.22 °C). Los ovinos alimentados con ensilaje de GTN sin inóculo consumieron más ensilaje (525.3 vs 435.3 gMS/d) y MS total (1172 vs. 1063 g/d).

En resumen, la adición de ninguno de los dos inóculos de BPAL, logró mucha mejora en las características fermentativas de las GTN, las cuales resultaron ser aceptables en los ensilajes

control. En ambos experimentos, los ensilajes con y sin inóculo, fueron estables a condiciones aeróbicas durante 5 días. Se observó un efecto positivo de la inoculación con Inóculo Comercial 1 sobre el CV, en el primer experimento, pero no así con el inoculante Inóculo Comercial 2 en la segunda oportunidad.

DEDICATORIA

Este trabajo realizado va dirigido principalmente a Dios, por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y llegar al grado de Maestría. A mis padres, Mario Rosario Pérez y Lillian E. López López, por brindarme la vida, sus consejos y apoyarme en todo momento. A mis hermanos, Mario y Vanessa, y a todos mis amigos que en algún momento aportaron en la realización de este trabajo. Finalmente a todos aquellos que me han apoyado y que de alguna forma han contribuido y compartido en mi formación como profesional y muy en especial en mi formación como ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por la sabiduría y entendimiento que me ha brindado durante el transcurso de mi vida. Quiero agradecer a mi comité graduado, Dr. Abner A. Rodríguez Carías (Presidente), por darme la oportunidad de continuar estudios graduados y completar una meta, al Dr. Paul F. Randel Følling por las correcciones de literatura y al Dr. Esbal Jiménez Cabán. Quiero agradecer a los compañeros y amigos, Sr. José Ariel Muñoz y Gabriel Figueroa, por su gran ayuda en la Finca Alzamora (RUM) con los ovinos y por dar de su tiempo y amistad. De igual forma quiero agradecer a las secretarias del Departamento de Industria Pecuaria, Jacqueline Rivera y Sonia Miranda por toda la ayuda prestada. A mis colegas y compañeros graduados Enrique Martínez Loarte, Viviana Rivera Burgos, Giovanna Emanuelli Oliver, Víctor Ramos Rivera, Natalia (Changa) Rivera Alejandro, Ricardo Domenech Emmanuelli, Orlando Ortega Colón, Wendelyn Méndez Maldonado, Javier Rivera Santana, José (Chonchi) Delgado Torres, Alejandra Torres Figueroa, y Samuel Prieto Pulido por las horas compartidas de clase y estudio en la oficina de estudiantes graduados de Industria Pecuaria. A mis compañeros de trabajo en la Finca Alzamora, Kimarie Jorge Rodríguez, Paola Ramos Nin, Raymond Mercado Bengochea, Luis (Fer Fer) De la Cruz, David Rivera Cruz y Cesar Ocasio Vega, en fin a todos mis compañeros que formaron de una forma u otra parte en la preparación de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
Abstract.....	ii
Resumen.....	iv
Dedicatoria.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Tabla de contenido	ix
Lista de cuadros	xi
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
1.0. Introducción.....	1
2.0. Objetivo.....	3
3.0. Revisión de Literatura.....	4
3.1. Bioquímica del Ensilaje.....	4
3.2. Microbiología del Ensilaje.....	5
3.2.1. Bacterias productoras de ácido láctico.....	6
3.2.2. Hongos y Levaduras.....	6
3.2.3. Enterobacterias.....	10
3.2.4. Clostridios.....	10
3.2.5. Bacterias productoras de ácido acético.....	11
3.2.6. Bacterias productoras de ácido propiónico.....	11
3.2.7. Fuentes de microorganismos en el proceso de ensilaje.....	12

3.3.	Proceso de Fermentación.....	14
3.4.	Estabilidad Aeróbica del Ensilaje.....	16
3.5.	Características de Ensilajes Tropicales.....	17
3.6.	Aditivos para ensilaje.....	18
3.7.	Inóculos de bacterias productoras de ácido láctico.....	19
3.8.	Consumo Voluntario de Ensilaje.....	23
4.0	Materiales y Métodos.....	25
4.1.	Material Vegetativo.....	25
4.2.	pH y Productos de Fermentación.....	27
4.3.	Estabilidad Aeróbica.....	28
4.4.	Consumo Voluntario.....	29
5.0.	Resultados y Discusión.....	31
5.1.	Experimento con Inóculo Comercial 1.....	31
5.1.1.	pH y Productos de Fermentación.....	32
5.1.2.	Estabilidad Aeróbica.....	37
5.1.3.	Consumo Voluntario.....	39
5.2.	Experimento con Inóculo Comercial 2.....	41
5.2.1.	pH y Productos de Fermentación.....	42
5.2.2.	Estabilidad Aeróbica.....	47
5.2.3.	Consumo Voluntario.....	49
6.0.	Conclusiones.....	51
7.0.	Implicaciones.....	52
8.0.	Referencias.....	53

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de aditivos para ensilaje	22
Cuadro 2. pH y composición química inicial de gramíneas tropicales naturalizadas ensiladas en microsilos con y sin Inóculo Comercial 1.....	32
Cuadro 3. Efecto del tratamiento y día sobre el pH y los productos de fermentación de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 1.....	36
Cuadro 4. Efecto del tratamiento y día de exposición aeróbica sobre el pH y la temperatura de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 1.....	38
Cuadro 5. pH y composición química inicial de gramíneas tropicales naturalizadas ensiladas en microsilos con y sin Inóculo Comercial 2.....	42
Cuadro 6. Efecto del tratamiento y día sobre el pH y los productos de fermentación de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 2.....	46
Cuadro 7. Efecto del tratamiento y día de exposición aeróbica sobre el pH y la temperatura de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 2.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fermentación de glucosa y fructosa por bacterias ácido lácticas homofermentativas.....	8
Figura 2. Fermentación de glucosa y fructosa por bacterias productoras de ácido láctico heterofermentativas.....	9
Figura 3. Fermentación de glucosa por <i>Clostridium spp</i>	13
Figura 4. Microsilos con válvulas de gas.....	26
Figura 5: Ensilaje de GTN expuesto a condiciones aeróbicas en recipientes de poliestireno forrado con bolsas de plástico y termómetros incrustados.....	29
Figura 6. Cordero macho tipo carne en jaula con comedero doble.....	31
Figura 7. Consumo total e individual de ensilaje con o sin Inóculo Comercial 1 y heno de gramíneas tropicales naturalizadas.....	40
Figura 8: Relación del consumo de ensilaje (CE) con y sin Inóculo Comercial 1 (CE) con el ensilaje ofrecido (EO) y con el consumo total (CT) expresadas como porcentajes	41
Figura 9. Consumo total e individual de ensilaje con o sin Inóculo Comercial 2 y heno de gramíneas tropicales naturalizadas.....	49
Figura 10: Relación del consumo de ensilaje (CE) con y sin Inóculo Comercial 2 (CE) con el ensilaje ofrecido (EO) y con el consumo total (CT) expresadas como porcentajes	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Acido Acético	AA
Acido Butírico	AB
Ácidos Grasos Volátiles	AGV
Acido Láctico	AL
Acido Propiónico	AP
Bacterias Productoras de Acido Acético	BPAA
Bacterias Productoras de Acido Butírico	BPAB
Bacterias Productoras de Acido Láctico	BPAL
Bacterias Productoras de Acido Propiónico	BPAP
Base Seca	BS
Carbohidratos Solubles en Agua	CSA
Consumo de Ensilaje	CE
Consumo de Heno	CH
Consumo Total	CT
Consumo Voluntario	CV
Diseño Complementario Aleatorio	DCA
Estabilidad Aeróbica	EA
Estación Experimental Agrícola	EEA
Ensilaje Ofrecido	EO
Fibra Detergente Acido	FDA
Fibra Detergente Neutro	FDN
General Linear Model (Modelo Linear General)	GLM
Gramíneas Tropicales Naturalizadas	GTN
Heno de Gramíneas Tropicales Naturalizadas	HGTN

Materia Inorgánica	MI
Materia Orgánica	MO
Materia Seca	MS
Materia Seca Total	MST
Nitrógeno Amoniacal / Nitrógeno Total	N-NH ₃ /N-Total
Nitrógeno No Proteico	NNP
Proteína Bruta	PB
Peso Vivo	PV
“Statistical Analyze System”	SAS
Tratamiento 1	T1
Tratamiento 2	T2
Unidades Formadoras de Colonias	UFC

1.0. INTRODUCCION

Las gramíneas tropicales naturalizadas (GTN) constituyen la base principal en la nutrición de la industria ganadera de Puerto Rico, ya que es el recurso más económico entre los alimentos utilizados bajo nuestras condiciones de producción. Sin embargo, las GTN varían en cantidad y calidad a través del año. Estas fluctuaciones se deben a las características de nuestro clima tropical, caracterizado por dos épocas: lluviosa y poco lluviosa y menos cálido. En la época de lluvia la producción de pastos es abundante teniendo un crecimiento óptimo con un valor nutritivo más elevado, mientras que en la época seca, la producción de pastos disminuye notablemente tanto cualitativa como cuantitativamente. Es muy común adoptar técnicas de conservación de forrajes para alimentar los animales en la época seca y escasez de alimentos, siendo el heno y el henilaje en pacas cilíndricas las más utilizadas. Algunos de los productores pecuarios producen su propio forraje conservado y otros lo compran a agricultores especializados en la producción de forrajes comercializados.

El ensilaje es un método de conservación de forraje que ocurre por medio de fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas con un alto contenido de humedad (Oude Elferink et al., 2001). El ensilaje bien logrado permite retener las cualidades nutritivas del forraje fresco por largo tiempo y la composición química lo más semejante al forraje original. Las características químicas y microbiológicas del forraje antes de fermentarse tienen importancia crítica en la determinación de la calidad del mismo. En regiones tropicales la producción de buenos ensilajes se hace difícil debido al bajo contenido de carbohidratos solubles en agua (CSA) y por las altas poblaciones epifíticas de microorganismos no deseables (i.e. coliformes, hongos, levaduras) presentes en los pastos tropicales, resultando en fermentaciones indeseables (Rodríguez, 1996).

A partir de la década de 1990, en regiones templadas y subtropicales, se popularizó la utilización de inóculos bacterianos para el mejoramiento de las características fermentativas y estabilidad aeróbica de los ensilajes. Diversos inóculos microbianos que contienen bacterias ácido lácticas, tipo homofermentativos y/o heterofermentativos, han sido utilizados mayormente con el propósito de mejorar la fermentación y estabilidad aeróbica de ensilajes de forrajes como maíz, trigo y sorgo (Weinberg et al., 1995; Rodríguez 1996; Ranjit y Kung., 2000; Oude Elferink et al 2000). Si se logra el propósito de obtener las características fermentativas adecuadas al utilizar estos aditivos microbianos, habrá en el forraje fermentado una población deseable y dominante de bacterias productoras de ácido láctico (BPAL); esto ocasiona un descenso en el pH que evita la proliferación de microorganismos no deseados y resulta en un ensilaje estable y de calidad. Hay poca información del uso de inóculos microbianos conteniendo BPAL como método para mejorar las características fermentativas de GTN tales como de hierbas guinea (*Panicum maximum*), johnson (*Sorghum halepense*), pangola (*Digitaria decumbens*) y buffel (*Cenchrus ciliaris*). Esta investigación se diseñó con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de dos inóculos microbianos comerciales sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario de ensilaje de GTN.

2.0. OBJETIVO

Determinar el efecto de la aplicación de dos inóculos microbianos comerciales sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario de ensilaje de gramíneas tropicales naturalizadas.

3.0. REVISION DE LITERATURA

El propósito principal en la conservación de forraje es conservarlo en estado óptimo y tener pérdidas mínimas de nutrientes para su uso en la alimentación animal (McDonald et al., 1991). Un método comúnmente utilizado es ensilar. Esta técnica de conservación de forraje se logra en forma natural por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas (Oude Elferink et al., 2001). Durante el proceso, ciertos microorganismos epifíticos (e.g. bacterias lácticas) producen principalmente ácido láctico (AL) el cual si está presente en concentración adecuada, hace preservar el material vegetativo por un periodo largo y libre de microorganismos no deseados responsables de fermentación secundaria, tales como hongos, coliformes, levaduras y clostridios.

3.1. Bioquímica del ensilaje

Un forraje apto para ensilar debe tener suficiente sustratos esenciales para los microorganismos, principalmente los carbohidratos solubles en agua (CSA), compuestos nitrogenados y ácidos orgánicos.

Los CSA, principalmente las hexosas (e.g. glucosa y fructosa) constituyen el principal sustrato para los microorganismos durante la fermentación. Bathurst (citado por McDonald et al., 1991) señaló que el contenido de fructosa en pastos de clima cálido es menor que en los pastos de clima templado. El contenido de CSA se ve afectado por las condiciones ambientales donde crece el material vegetativo y el estado de madurez del mismo (McDonald et al., 1991). Forrajes más maduros contienen menos CSA, y éstos se encuentran en forma cristalinizada y por tanto menos disponible para los microorganismos. Asimismo, el contenido de CSA en gramíneas tropicales es menor que en gramíneas típicas de zonas templadas (McDonald et al., 1991).

Los compuestos nitrogenados, presentes en el material vegetativo, abarcan macromoléculas como las proteínas y compuestos de menor tamaño molecular, tales como aminoácidos, aminos, amidas, péptidos y otros, que pueden degradarse durante el transcurso de la fermentación en el silo. El 75 a 90% del nitrógeno total en gramíneas frescas está presente en forma de proteínas. El número de aminoácidos presentes en la proteína vegetal no varía grandemente con respecto a la especie botánica, pero el factor más influyente en la concentración de proteína es la etapa de crecimiento de la planta. Entre 10 hasta 25% del nitrógeno total del forraje está formado por componentes no proteicos, cuyos niveles son mayores en forraje fertilizado con nitrógeno. En general, el contenido de proteína en gramíneas tropicales es menor que en las de clima templado (McDonald et al., 1991). Las proteínas y los compuestos nitrogenados no proteicos del forraje contribuyen a la capacidad amortiguadora y en el contenido de N-amoniaco del ensilaje producido (Playne y McDonald, 1966).

Los principales ácidos orgánicos presentes en las plantas forrajeras son el málico y el cítrico. Estos son los responsables de la mayor parte del efecto amortiguador original y en los ensilajes bien logrados. La fermentación de los ácidos orgánicos (e.g. málico, cítrico) da como resultado la formación de 2,3-butanodiol, acetato, formato, etanol, y dióxido de carbono (McDonald et al.1991). La acidificación desarrollada durante el ensilaje se debe principalmente a la formación de lactato y acetato, y el resultante descenso en el pH es un factor de importancia primordial para la preservación del forraje. Otros ácidos orgánicos presentes en menor concentración en forrajes son el succínico y oxaloacético.

3.2. Microbiología del Ensilaje

La microflora del ensilaje es bien diversa y su naturaleza es importante para el éxito del proceso de conservación. Estos microorganismos pueden clasificarse en dos tipos, los benéficos

BPAL responsables de la rápida acidificación y los indeseables (causan deterioro). Los indeseables más importantes abarcan los aeróbicos (e.g. bacilos), los anaeróbicos facultativos (e.g. enterobacterias, coliformes), hongos, levaduras y los clostridios (Nout y Rombouts, 1992). También, existen en el forraje otros grupos de microorganismos como bacterias productoras de ácido acético (BPAA) y bacterias productoras de ácido propiónico (BPAP).

3.2.1. Bacterias productoras de ácido láctico

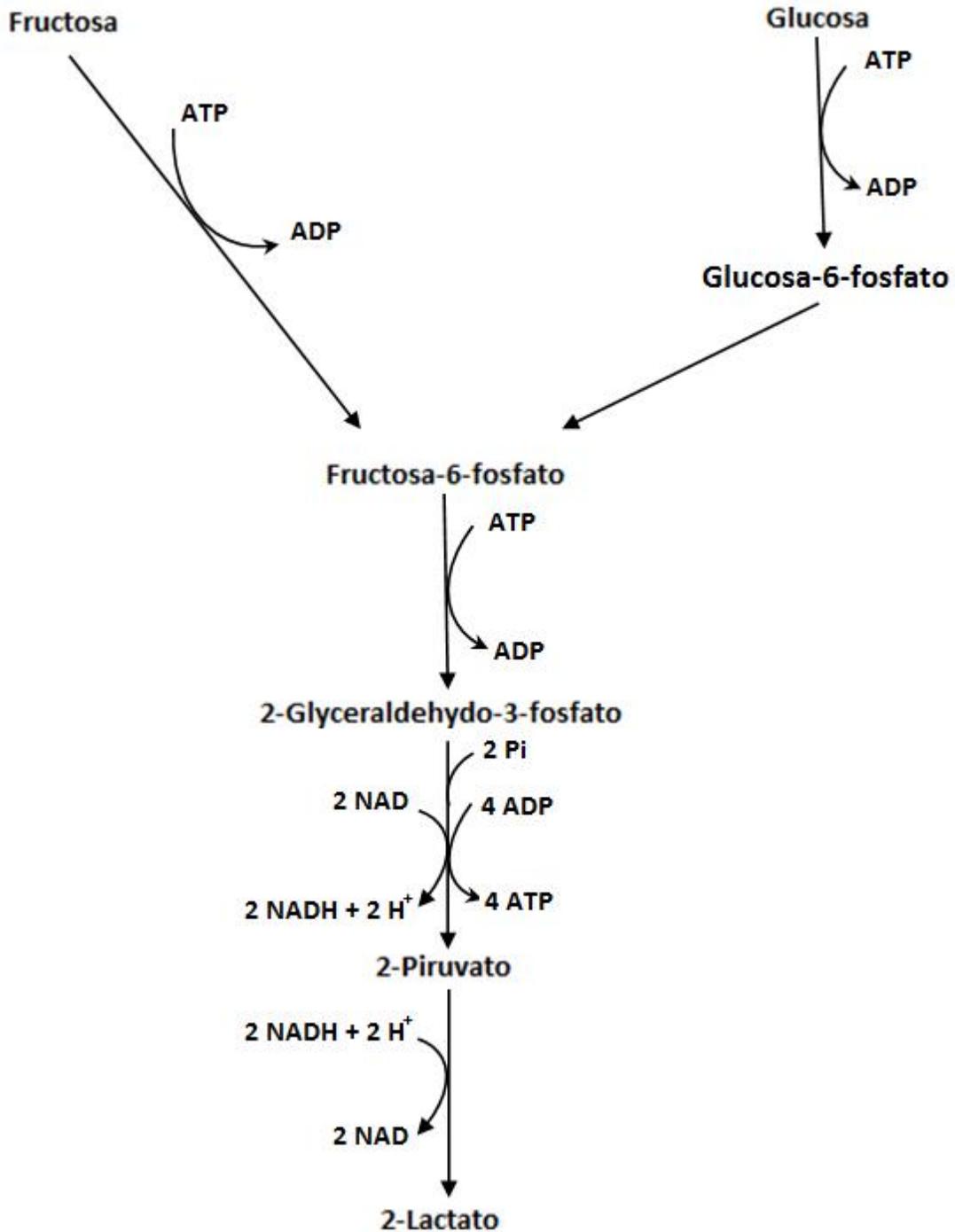
Las BPAL son microorganismos Gram positivos, anaeróbicos o anaeróbicos facultativos que forman parte de la microflora epifítica de los forrajes. La actividad principal de estos microorganismos es fermentar carbohidratos y transformarlos en ácidos orgánicos. Las BPAL se clasifican como homofermentativas y heterofermentativas, de acuerdo a sus características y vías metabólicas al degradar carbohidratos. Las BPAL homofermentativas generan como principal producto final el AL (Figura 1). Estas convierten más del 85% de las hexosas presentes (como glucosa) en AL, pero no pueden degradar las pentosas (como xilosa). Las heterofermentativas también producen principalmente AL a partir de hexosas, pero además pueden degradar algunas pentosas produciendo AL, ácido acético (AA), CO₂ y a veces etanol (Figura 2). Las homofermentativas son más deseables que las heterofermentativas en el proceso de ensilar ya que degradan más eficientemente las hexosas, lo que resulta en una mayor producción de AL y descenso en el pH. Algunas BPAL son capaces de metabolizar ácidos orgánicos (cítrico, málico) presentes en el forraje, convirtiéndolos a 2,3 butanodiol, acetona, etanol y sales de ácidos orgánicos (lactato, acetato y formato) (McDonald et al., 1991).

3.2.2. Hongos y Levaduras

Los hongos son organismos eucariotas y su proliferación en el ensilaje está asociada a la presencia de oxígeno, lo que propende a inestabilidad aeróbica (McDonald et al., 1991). Además

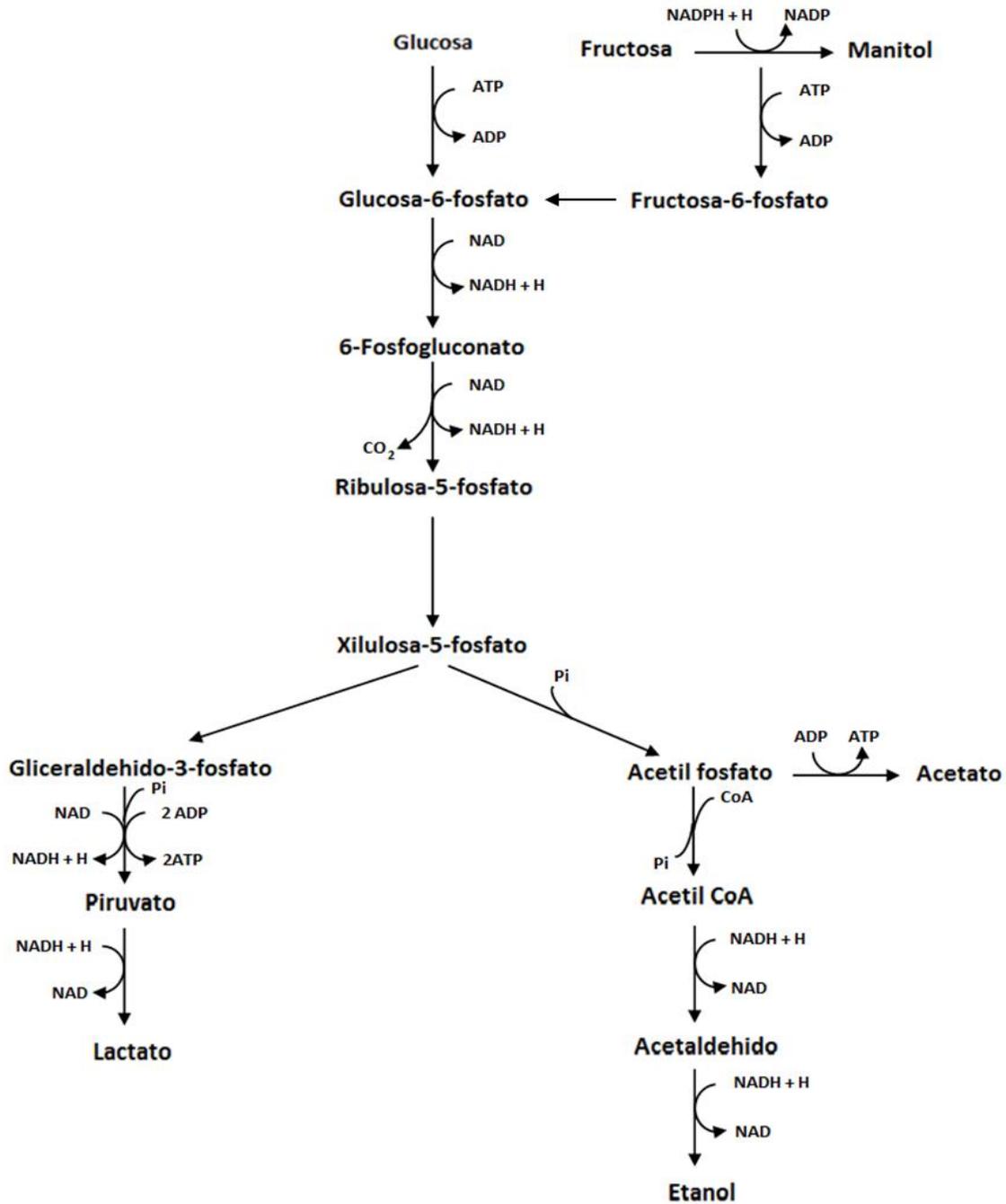
la presencia de hongos está relacionada con la producción de toxinas (como aflatoxina) lo que disminuye el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje (Oude Elferink et al., 2001).

Las levaduras son microorganismos eucariotas, unicelulares y anaeróbicos facultativos que pueden tolerar medios ácidos (Henderson et al., 1982). La actividad metabólica de estos microorganismos en el silo se reduce cuando el AL alcanza su máximo de concentración, pero aumenta con la utilización de los azúcares residuales. La presencia de levaduras en los ensilajes es indeseable debido a que su utilización de fuentes de carbono es ineficiente y poblaciones grandes de las mismas producen ensilajes susceptibles a deterioro aeróbico. Además, compiten con las BPAL por sustratos (hexosas y pentosas) para convertirlos en etanol y CO₂ (Schlegel, 1987).



Resumen: Hexosa + 2ADP + 2Pi = 2 Lactato + 2ATP + 2H₂O

Figura 1. Fermentación de glucosa y fructosa por bacterias ácido lácticas homofermentativas. (Adaptada de McDonald et al., 1991).



Resumen: $\text{Glucosa} + \text{ADP} + \text{Pi} = \text{Lactato} + \text{Etanol} + \text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$
 $3 \text{ Fructosa} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} = \text{Lactato} + \text{Acetato} + 2 \text{ Manitol} + \text{CO}_2 + 2\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
 $\text{Glucosa} + 2 \text{ Fructosa} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} = \text{Lactato} + \text{Acetato} + 2\text{Manitol} + \text{CO}_2 + 2\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$

Figura 2. Fermentación de glucosa y fructosa por bacterias productoras de ácido láctico heterofermentativas. (Adaptada de McDonald et al., 1991).

3.2.3. Enterobacterias

Estos son microorganismos que se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal animal y también pueden estar presentes en los ensilajes. Se trata de bacterias de tipo Gram negativo, anaeróbicos facultativos, que no forman esporas ni son patogénicos. Fermentan carbohidratos para producir mayormente ácido acético y fórmico. Este segundo puede acumularse o, alternativamente, en medios ácidos puede ser convertido en hidrógeno y dióxido de carbono. Las enterobacterias compiten con las BPAL por la degradación de azúcares y proteínas: producen compuestos tóxicos, tales como aminas biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple, lo que afecta negativamente la palatabilidad del ensilaje (Woolford, 1984).

Los coliformes son enterobacterias, capaces de producir grandes cantidades de amoníaco en ensilajes mal preservados (Givens et al., 1993). El pH ideal para favorecer los coliformes es cercano a 7.0, lo cual indica que es sensible a medios ácidos (McDonald et al., 1991). Por otro lado, si las BPAL no se establecen rápidamente y el pH no se reduce lo suficiente, los coliformes pueden alcanzar altas poblaciones y su capacidad para la producción de toxinas, dan como resultado ensilajes de baja aceptabilidad, perjudiciales a la salud animal.

3.2.4. Clostridios

Se trata de microorganismos que forman esporas y proliferan al ensilar forrajes demasiado húmedos o con bajos contenidos en CSA, si el pH no disminuye lo suficiente (> 5) (Oude Elferink et al., 2001). Los clostridios pueden degradar carbohidratos para producir ácido butírico (AB) y dióxido de carbono, lo que resulta en un aumento en pH (Figura 3). Un pH alto crea condiciones óptimas para la proliferación de ciertos tipos de clostridios que fermentan compuestos de nitrógeno no proteico (NNP) con liberación de amoníaco y la formación de olores desagradables (a podrido) y posiblemente toxicidad (Church et al., 2002). El método común de

inhibir el crecimiento de clostridios es promoviendo una alta concentración de ácido láctico mediante una activa fermentación láctica. Un pH de 4.0 previene la actividad de los clostridios y puede preservar un ensilaje por tiempo indefinido (McDonald et al., 1991).

3.2.5. Bacterias productoras de ácido acético (BPAA)

Los microorganismos así clasificados son Gram negativos, móviles y aeróbicos, que oxidan alcoholes (e.i etanol) produciendo los ácidos orgánicos sobre todo el acético como producto final. Tienen una alta tolerancia a la acidez y pueden crecer a pH menores de 5.0. Algunos investigadores, como Spoelstra et al., (1988), observaron que las BPAA pueden iniciar un deterioro aeróbico en ensilaje de planta entera de maíz. Sin embargo, en estudios más recientes por Filya (2003) y Ranjit y Kung. (2000) con silos de laboratorio, la bacteria heterofermentativa, *L.buchneri*, produjo altos niveles de ácido acético y su aplicación mejoró la estabilidad aeróbica del ensilaje atribuible a su efecto antimicótico.

3.2.6. Bacterias productoras de ácido propiónico (BPAP)

Las BPAP son microorganismos Gram positivos, anaeróbicos que pueden fermentar azúcares y AL a AA y ácido propiónico (AP). La utilización de BPAP como inóculo en el ensilaje ha sido objetivo de varias investigaciones. Canzi et al., (1993) demostraron que la adición de BPAP en cultivo puro, redujo la concentración de oxígeno en el forraje ensilado de 20% a 5% o menos. Weinberg et al., (1995) encontraron que la adición de un inóculo con BPAP mejoró la estabilidad aeróbica de ensilajes de millo (*Panicum miliaceum*) y de trigo, pero no de ensilaje de maíz o sorgo. Higginbotham et al., (1998) añadieron un inóculo con *Propionibacterium shermanii* a ensilaje de maíz y observaron un bajo contenido de levaduras, un alto contenido de BPAL y mejor estabilidad aeróbica durante la fase de alimentación. Kung y

Shaver (2001), argumentan que estas bacterias no tienen la capacidad de competir en ambientes normales de ensilajes, lo que limita su uso bajo condiciones prácticas.

3.2.7. Fuentes de microorganismos en el proceso de ensilaje

Los microorganismos epifíticos que se encuentran en el forraje antes de la cosecha principalmente en las hojas, representan la principal fuente microbiótica para el proceso de ensilamiento. Su presencia cualitativa y cuantitativa depende de factores tanto de la planta (especie, estado de madurez) como del ambiente (temperatura, humedad, radiación solar). Según Fenton (citado por Rodríguez, 1996) la cantidad de estos microorganismos epifíticos puede variar desde no detectable hasta 10^4 - 10^6 ufc/g de material fresco. Sin embargo, los coliformes, hongos, levaduras y bacterias aeróbicas son generalmente los microorganismos que predominan antes de la cosecha (Lindgren et al., citado por Rodríguez, 1996). Las BPAL también se encuentran en la superficie de las plantas, donde las heterofermentativas tienen mayor participación que las homofermentativas. Sin embargo, las BPAL sólo representan menos del 10% de la población total de los microorganismos epifíticos (Fenton, citado por Rodríguez, 1996).

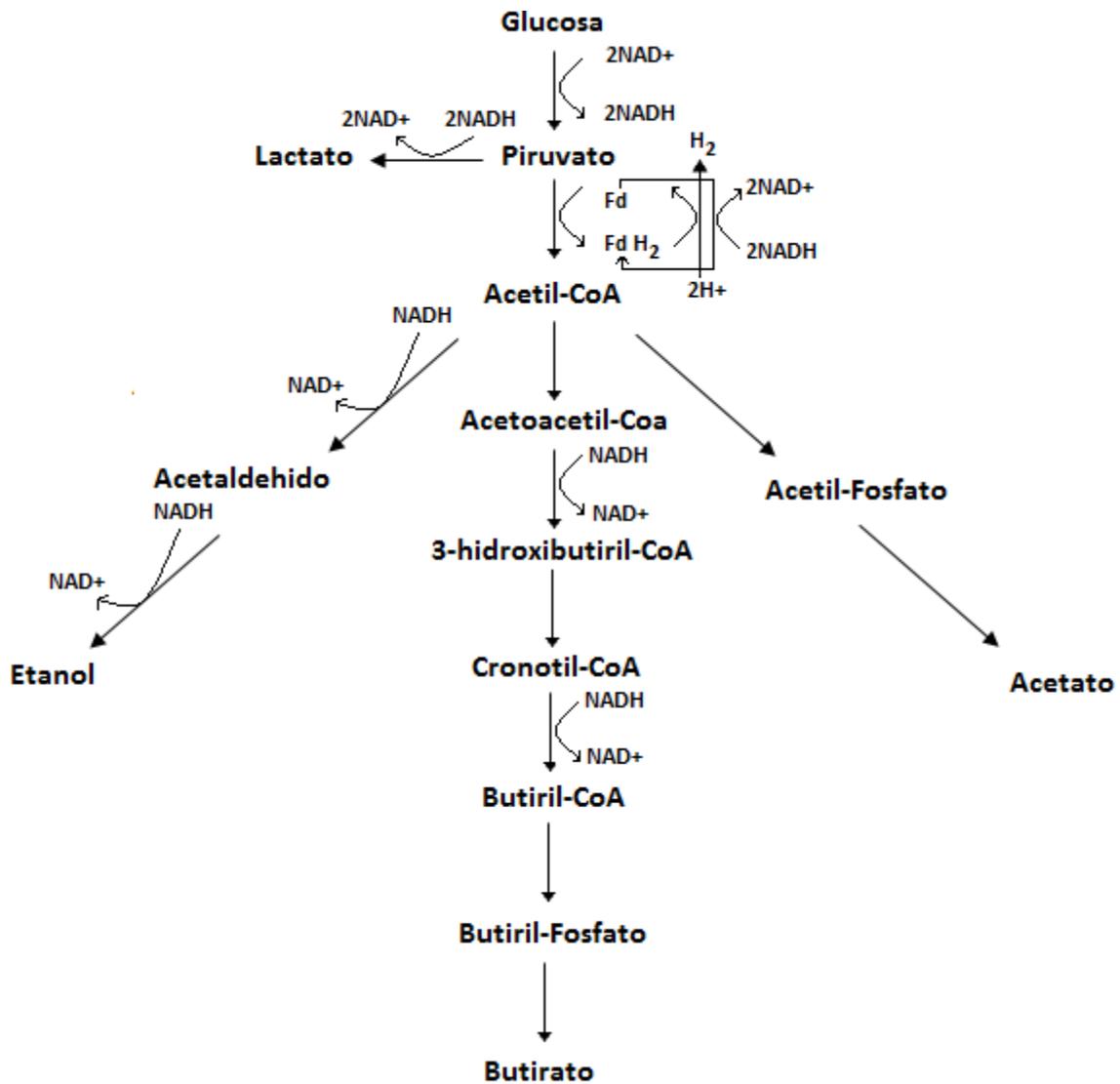


Figura 3. Fermentación de glucosa por *Clostridium* spp. (Adaptada de Cai et al., 2011).

3.3. Proceso de Fermentación

La fermentación del material vegetativo ocurre espontáneamente en un ambiente láctico, bajo condiciones anaeróbica, teniendo como resultado un bajo pH. En la práctica, este proceso comienza con el corte del forraje y deposición del mismo en el silo, y termina cuando se abre el silo y el ensilaje se expone al aire. El progreso del proceso de ensilamiento se divide en seis fases de acuerdo a los cambios bioquímicos, microbiológicos y ambientales que ocurren durante la fermentación. Estos cambios han sido descritos por varios investigadores (Gibson et al., 1958; Beck, 1978; Seglar, 1993) y se resumen a continuación.

Fase 1. Aeróbica:

Esta fase comienza cuando el forraje es cortado y depositado en el silo e involucra la respiración celular del material vegetativo, y a los microorganismos aeróbicos (e.g. BPAL, levaduras) y cesa cuando se ha creado un ambiente anaeróbico en el silo al agotarse el oxígeno. Además hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas. Ocurre la hidrólisis de almidón hasta monosacáridos que los microorganismos utilizan para generar AL y comienza el descenso del pH. Los microorganismos epifíticos de la planta (i.e. bacterias aeróbicas, hongos, levaduras) convierten los CSA en CO₂, agua y calor que resulta en un aumento leve en temperatura.

Fase 2. Anaeróbica:

Al terminar la fase aeróbica, comienza la segunda fase que se designa anaeróbica. Esta fase es de corta duración y corresponde al comienzo del crecimiento exponencial de las BPAL. Las bacterias anaeróbicas intensifican su

actividad fermentativa y convierten los CSA en AL y los ácidos grasos volátiles (AA, AP, AB), CO₂ o etanol. Aumenta la acidez y disminuye la temperatura de la masa vegetativa.

Fase 3. Acumulación de ácido láctico:

En esta, la producción de AL y el crecimiento de las BPAL continúan a modo exponencial, disminuyendo el pH. Esta fase finaliza cuando el contenido de CSA disminuye, pudiendo llegar donde este se agota, y la disminución del pH se detiene. Esto puede ocurrir antes de la acumulación de ácido láctico para estabilizar el forraje.

Fase 4. Estable:

Durante esta fase continua la fermentación pero a menor velocidad, con una conversión del CSA restante y de los ácidos orgánicos (AA, AP, AB) por las BPAL y otros microorganismos. Al finalizar esta fase, el pH y la temperatura se estabilizan y las poblaciones de BPAL comienzan a disminuir.

Fase 5. Almacenamiento:

En esta fase podría ocurrir proliferación de microorganismos indeseables como clostridios, hongos y levaduras, si la producción de AL en las fases anteriores no fue suficiente. El factor principal que afecta la calidad del ensilaje durante el almacenamiento es la entrada de oxígeno al silo. Esto facilita el desarrollo de hongos y levaduras, causando pérdidas de materia seca (MS) y calentamiento del material ensilado.

Fase 6. Alimentación:

Esta fase final, comienza cuando se abre el silo y se expone el ensilaje a condiciones aeróbicas y dura hasta el momento de su consumo por los animales.

En esta fase ocurre desperdicio de ensilaje por deterioro aeróbico.

3.4. Estabilidad Aeróbica del Ensilaje

La estabilidad aeróbica (EA) se refiere al periodo de tiempo en que el ensilaje se mantiene fresco y no se deteriora después de que se expone al aire (Kung, 2005). Según el criterio de Kleinschmit y Kung (2006), la EA puede ser definida también como la resistencia al aumento de temperatura del ensilaje. La exposición del ensilaje al oxígeno causa cambios en la composición química, temperatura, pH y poblaciones de microorganismos (e.g. crecimiento de bacterias aeróbicas, hongos y levaduras). Al exponer el material ensilado a oxígeno, se cambia de un estado anaeróbico a otro aeróbico. Esto provoca rápidamente el deterioro aeróbico en las superficies del material ensilado, al proliferarse microorganismos, como los hongos, a temperaturas mayores a 37°C y pH mayores a 5 (Muck y Pitt, 1993). El aumento en temperatura promueve la oxidación microbiana de cualquier CSA residual y del AL para producir CO₂, agua, y calor (Honning y Woolford, 1979). Spoeltra et al., (1988) determinaron que el aumento en pH y temperatura que se observa al exponer el ensilaje al oxígeno, proviene del metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos por microorganismos no deseados (i.e. bacterias aeróbicas, hongos y levaduras). Durante las primeras etapas de deterioro, las concentraciones de fibra bruta, PB y cenizas tienden a aumentar. La asimilación de AL y CSA residual por microorganismos aeróbicos resulta en un aumento en el pH y está correlacionado con altas temperaturas y pérdidas de MS (McDonald et al., 1991). Woolford (1990) también señaló que el deterioro del ensilaje

expuesto al oxígeno resulta en pérdidas de MS y nutrientes. El grado de EA del ensilaje (resistencia al deterioro) se ve afectada por varios factores incluyendo las concentraciones de oxígeno y de dióxido de carbono presentes, la población microbiana, el tipo de forraje y contenido de MS del mismo y la temperatura (Pitt, 1990).

3.5. Características de Ensilajes Tropicales

En la mayoría de los países tropicales el uso de ensilaje es limitado. Wilkinson (citado por Church et al., 2002) señala que los pastos tropicales tienen típicamente menos CSA que los de clima templado y que la planta debe tener un contenido mínimo de 3% de CSA para garantizar una fermentación adecuada. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que gramíneas tropicales como el elefante (*Pennisetum purpureum*) y otras del género *Panicum*, pueden ensilarse satisfactoriamente (Church et al., 2002). Por el contrario, McDonald et al., (1991) indican que las características fermentativas de los forrajes de las regiones tropicales suelen no ser satisfactorias. Según Catchpoole y Henzell (citados por Martínez, 1998) y Namihira et al., 2009, los ensilajes producidos en climas tropicales se caracterizan por bajo contenido de AL, un alto contenido de AA y un pH alto. Esto debido a bajo desarrollo de poblaciones de BPAL que no cuentan con suficiente substrato de CSA presente en los forrajes ensilados, a diferencia de los forrajes más usados en clima templado. El proceso fermentativo de ensilamiento en climas tropicales puede malograrse debido a altas poblaciones de hongos, coliformes y levaduras, a diferencia de lo usual en climas templados donde predominan las BPAL (McDonald et al., 1991). En el subtrópico del estado de Florida, Adesogan (2006), encontró que maíz ensilado a 42°C tuvo menor concentración de AL y AA y mayor concentración de amonio y más alto pH que maíz ensilado a una temperatura más fresca. Bajo estas condiciones de alta temperatura, la fermentación tiende a ser más heteroláctica que homoláctica. Muck et al. (2003) traen a colación que ensilajes hechos bajo condiciones cálidas

son más propensas a sufrir una fermentación clostridial. Namihira et al., (2009), encontraron que el contenido de nitrato en los forrajes tropicales es un factor importante que influye en la calidad del ensilaje y que un adecuado manejo del forraje fertilizado con nitrógeno puede facilitar una fermentación exitosa y ensilajes estables de gramíneas sin pre-tratamiento. Además, se ha observado que ensilajes con alto contenido de nitrógeno, a pesar de su correspondiente mayor capacidad amortiguadora, presentan una mejor fermentación láctica que aquellos con bajo contenido de nitrógeno. Otro factor involucrado puede ser diferencias en los microorganismos presentes.

3.6. Aditivos para ensilaje

Los aditivos se utilizan para mejorar las características fermentativas y estabilidad aeróbica, reduciendo así la pérdida de nutrientes y mejorando la aceptabilidad del ensilaje por parte de los animales. Se recomienda el uso de aditivos para ensilajes para conservar el valor nutritivo original del forraje cuando existen algunos factores que dificultan una fermentación adecuada (Contreras y Muck, 2006).

Muck (1993), informó que la utilización de aditivos (inóculos bacterianos) fue exitosa principalmente con ensilajes de alfalfa y de pastos templados pero con el ensilaje de maíz mostró un efecto limitado. Así mismo, Wilkinson (1998), concluyó que los mismos efectos beneficiosos obtenidos con el uso de los aditivos en ensilajes de forrajes de climas templados, no es de esperar que ocurran también en ensilajes de forrajes tropicales. Estos forrajes tropicales poseen mayor contenido de fibra y mayor lignificación que aquellos forrajes de clima templado. Además, como obstáculos adicionales hay ciertas características que son peculiares a los forrajes tropicales, como su forma estructural, anatómica y química, que reducen su valor nutritivo en cuanto a consumo voluntario (CV) y fermentación en el rumen (Wilson, 1997). Tales características

pueden afectar la facilidad de cosechar, marchitar, triturar y compactar el material en el silo con implicaciones para el proceso de fermentación.

Los aditivos para ensilaje se clasifican en cinco categorías basadas en su mecanismo de acción: (1) estimulantes de la fermentación, (2) inhibidores de la fermentación, (3) promotores de la estabilidad aeróbica, (4) nutrientes fermentables y (5) absorbentes de líquidos (Cuadro 1).

3.7. Inóculos de bacterias productoras de ácido láctico

Los inoculantes bacterianos para el ensilaje representan un tipo de aditivos disponibles en el mercado que estimulan la fermentación e inhiben el deterioro aeróbico (Charley, 2006). Los inóculos bacterianos consisten de microorganismos inactivos, desecados, que se activan cuando se adicionan al forraje (Martínez, 1998). Los microorganismos son principalmente BPAL (homofermentativas) seleccionadas que se utilizan procurando dominar la fermentación y reducir las pérdidas de nutrientes al promover la producción de lactato y la acidificación rápida (Huisden et al., 2009). También existen inóculos con ambos tipos de BPAL, que buscan combinar una rápida reducción inicial en el pH, efectuada por las bacterias homofermentativas y más tarde una buena estabilidad aeróbica a cargo de bacterias heterofermentativas que producen más AA (Contreras et al., 2009). Bolsen (1999) recomendó el uso de inoculantes bacterianos para todo tipo de forraje ensilado, basándose en varias investigaciones donde se mejoró consistentemente la eficiencia de la fermentación, la recuperación de la MS, la conversión alimentaria y el aumento de peso vivo (PV) por tonelada de ensilaje de maíz y sorgo forrajero.

Seale (1986) y Muck (1988) definen las características que los microorganismos de un inóculo bacteriano deben poseer como las siguientes:

- a) Las BPAL deben tener un crecimiento vigoroso y ser capaces de competir con y dominar otros organismos durante la fermentación.
- b) Deben ser preferiblemente de tipo homofermentativas y producir gran cantidad de AL a partir de hexosas.
- c) Deben tolerar acidez y ser capaces de producir un pH cercano a 4.0 lo más rápido posible, para inhibir el crecimiento de otros microorganismos.
- d) Deben fermentar glucosa, fructosa, sacarosa, fructanos y preferiblemente pentosas.
- e) No deben producir dextrinas a partir de glucosa o manitol a partir de fructosa.
- f) No debe tener acción sobre ácidos orgánicos.
- g) Deben ser capaces de crecer a temperaturas de hasta 50°C.
- h) Deben ser capaces de crecer en un material con bajo contenido de humedad.
- i) No deben poseer actividad proteolítica.

Si el inóculo utilizado presenta las características mencionadas anteriormente, se espera cambios en el ensilaje, como dominancia de BPAL, aumento de AL y reducción de pH.

Se han realizado investigaciones con inóculos bacterianos en climas templados desde mediados del siglo XX. Bryan-Jones y Carpintero et al., (citado por McDonald et al., 1991), concluyeron que la adición del inóculo en ensilaje de *ryegrass*, mejoró el pH y las características fermentativas significativamente. McDonald et al., (1991) informaron que la inoculación de pastos ensilados a una temperatura de 42°C resultó en una población más alta de clostridios y una concentración mayor de AL que las presentes en pastos ensilados a 20°C.

En el trópico de Puerto Rico se han realizado pocos estudios sobre la utilización de inóculos bacterianos en ensilajes. Rodríguez (1996) no pudo demostrar que el uso de un inoculante microbiano evitara el deterioro de ensilaje de sorgo forrajero al exponerse a

condiciones aeróbicas. Al ensilar sorgo granífero (*Sorghum bicolor*), Martínez et al., (1999) añadieron un inóculo comercial de BPAL a tres niveles diferentes (0,1 ó 2 veces la dosis recomendada) y encontraron que el inóculo a la dosis recomendada mejoró ciertas otras características, pero no la estabilidad aeróbica, y tampoco se logró efecto positivo al aumentar la dosis al doble de lo recomendado. Adesogan et al., (2004) ensilaron pasto Bermuda inoculado con *P. pentosaceus* y *L. buchneri*, y observaron una mejoría en la fermentación pero no en la estabilidad aeróbica debido a una fermentación butírica.

Cuadro 1. Clasificación de aditivos para ensilaje

Estimulantes de la Fermentación		
<u>Cultivo de Bacterias</u> Bacterias Acido Lácticas		<u>Fuente de Carbohidratos*</u> Glucosa Sacarosa Melaza Cereales Trigo Pulpa Remolacha Pulpa Cítricos Papa Celulosa
Inhibidores de la Fermentación		
<u>Ácidos</u> Ácidos Minerales Ácido Acético Ácido Láctico Ácido Benzoico Ácido Acrílico Ácido Glicólico Ácido Sulfámico Ácido Cítrico Ácido Sórbico		<u>Otros</u> Formaldehido Paraformaldehido Nitrito de sodio Dióxido de sulfuro Metabisulfito de sodio Bisulfato de amonio Cloruro de sodio Antibióticos Dióxido de carbono Bisulfito de carbono Hexametenetetránima Bronopol Hidróxido de sodio
<u>Inhibidores del deterioro aeróbico</u> Bacterias Acido Lácticas Ácido Propiónico Ácido Caprónico Ácido Sórbico Paramicina Amoniaco	<u>Nutrientes*</u> Urea Amoniaco Biuret Minerales	<u>Absorbentes</u> Pulpa Remolacha Azucarera Paja Cebada Polímeros Bentonita

*La mayoría de las sustancias incluidas en las fuentes de carbohidrato también pueden ser incluidos en los nutrientes.
Adaptada de McDonald et al., 1991.

3.8. Consumo Voluntario de Ensilaje

El CV es uno de los criterios utilizados para determinar el valor nutritivo de los alimentos y es influenciado por las características del animal y del forraje. El CV del forraje es un importante factor determinante de la producción animal. El consumo del ensilaje en rumiantes es controlado por los mismos mecanismos básicos que regulan el consumo de forrajes en general, y podría ser mayor o menor del mismo forraje en forma fresca o seca (McDonald et al., 1991). Dulphy (1980), (citado por McDonald et al., 1991) señala reducciones en el consumo de MS hasta un 50% en gramíneas frescas cortadas y ofrecidas directamente al animal cuando se compara con ensilaje de gramínea. Rook y Gill (1990) y Wilkins et al. (1971) demostraron que el consumo de MS del ensilaje está relacionado con las características fermentativas, como concentraciones de los ácidos orgánicos (AL y AA), amoníaco y nitrógeno total. McLeod et al., (1970) encontraron que la adición de AL al ensilaje, redujo el consumo voluntario de MS en ovejas. Por otro lado, Thomas et al., (citado por McDonald et al., 1991) demostraron que la adición de AL al ensilaje de gramíneas, no tuvo efecto significativo sobre el consumo de MS en novillas, pero cuando se adicionó AA el consumo se redujo. El AL no parece influir en el consumo voluntario de MS del ensilaje, aunque cuando se expresa como una proporción de los ácidos orgánicos totales, puede dar una indicación relativa de consumo de ensilaje (Wilkins et al., 1971). El nitrógeno amoniacal es producido durante la fermentación de los ensilajes debido a la acción proteolítica de microorganismos del género *Clostridium* y *Enterobacteria* (McDonald et al., 1991). Según Wilkins et al., (1971) el contenido del nitrógeno amoniacal de los ensilajes, expresado como porcentaje del nitrógeno total ($N-NH_3/N\text{-Total}$), se correlaciona negativamente con el CV. Sin embargo, otros estudios no evidencian que el nitrógeno amoniacal tenga un efecto negativo en el CV de los ensilajes (Rook, 1991). Thomas (1985) concluye que el $N-NH_3/N$ -

Total, puede proporcionar un índice para separar ensilajes de bajo consumo, de ensilajes bien fermentados y mejor consumidos.

Teller et al., (1990) señalan que el tamaño de partículas del material vegetativo influye sobre el CV del ensilaje ya que partículas pequeñas facilitan una mejor fermentación en el silo y un incremento en la tasa de pasaje del material vegetativo a través del tracto digestivo. Al reducir el tamaño de partículas del ensilaje, se ha observado aumentos significativos en el consumo de MS (Thomas et al., 1976). Al reducir el tamaño de partículas, se aumenta el consumo de ensilaje de dos maneras: por facilitar la fermentación ruminal y aumentar la tasa de pasaje del contenido del rumen (McDonald et al., 1991). Por otra parte, Ojeda (1988) concluye que la disminución en el CV del ensilaje está relacionada con el deterioro debido a la exposición aeróbica.

4.0. MATERIALES Y METODOS

Se realizaron dos experimentos cada uno de los cuales constó de un trabajo de ensilamiento en el laboratorio y una prueba de CV in vivo con corderos. Se evaluaron dos productos comerciales basados en BPAL homofermentativas y heterofermentativas. En el primer experimento, el producto evaluado fue Inóculo Comercial 1, un inoculante microbiano diseñado para mejorar la fermentación y reducir o evitar la descomposición de los forrajes ensilados. Contiene cepas ácido lácticas heterofermentativas y homofermentativas de *L. buchneri*, en combinación con *P. pentosaceus*. En el segundo experimento, se evaluó Inóculo Comercial 2, un inoculante compuesto por bacterias homofermentativas y heterofermentativas ácido lácticas tales como *E. faecium*, *L. brevis* y *L. plantarum*, que alegadamente ayuda a alcanzar una estabilidad óptima tanto anaeróbica como aeróbica en ensilajes de gramíneas, alfalfa, trébol, y otros forrajes. Ambos son productos en forma de polvo, dispersables en agua.

4.1. Material Vegetativo

En ambos experimentos, el material vegetativo se cosechó en predios pertenecientes a la vaquería de la Estación Experimental Agrícola (EEA) de la Universidad de Puerto Rico, localizada en el Municipio de Lajas. Las GTN utilizadas en ambos experimentos constaron mayormente de una combinación de hierbas guinea (*Panicum maximum*), johnson (*Sorghum halepense*), pangola (*Digitaria decumbens*) y buffel (*Cenchrus ciliaris*). Las GTN utilizadas del experimento 1, fueron cosechadas a 90 días de madurez, mientras que en el experimento 2 a los 60 días de madurez. Las GTN del experimento 1 se cortaron mecánicamente a 5.08cm del suelo, lo que resultó en contaminación con material inorgánico (suelo), mientras en el experimento 2 se cortaron las plantas a 15.24cm en un intento por reducir la recogida de suelo junto con la materia vegetal. El forraje fue cortado en el mismo predio, pero dos lugares diferentes en los dos

experimentos. Antes de ensilar se trituró el forraje mecánicamente con una cortadora de forraje (New Holland serie 36), para reducirlo a un tamaño teórico de 2.5 cm de largo y se asignó a uno de los dos tratamientos experimentales: (T1) sin aditivo (control), y (T2) con el inóculo comercial de BPAL correspondiente aplicado a razón de 10^6 y 10^{10} ufc/g de material fresco para Inóculo Comercial 1 y Inóculo Comercial 2. El inóculo comercial se aplicó foliarmente al material vegetativo triturado. Este fue mezclado manualmente con y sin el aditivo y ensilado en microsilos de PVC de 1.2 kg de capacidad (Figura 4).

Antes de ensilarse el forraje, se tomó una muestra para análisis de su contenido de MS mediante el secado al horno a 64°C por 48 horas. Los contenidos de materia orgánica (MO), materia inorgánica (MI), proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA), lignina, y CSA fueron determinados en un laboratorio comercial (Dairy One, Forage Lab, Ithaca, NY), utilizando metodología establecida (A.O.A.C., 1991; Van Soest et. al. 1991).



Figura 4. Microsilos con válvulas de gas

4.2. pH y Productos de Fermentación

Para monitorear las características fermentativas y composición química al transcurrir el proceso de ensilamiento, se analizaron muestras del material vegetativo fresco y se abrieron y muestrearon el contenido de tres silos por tratamiento a los 0, 4, 7, 14, 21, 28 y 35 días de fermentación. Las muestras correspondientes a cada periodo de fermentación, se sometieron a determinación de pH y productos de fermentación. Para determinar el pH, se mezclaron 50g de cada muestra con 450ml de agua destilada (pH 7.0) y se agitó en una máquina homogeneizadora por dos minutos. El extracto acuoso resultante se filtró a través de gasa de tela y el filtrado se utilizó para medir el pH, realizado con un medidor equipado con electrodo, estandarizado para pH 4 a 7 utilizando soluciones amortiguadoras comerciales. La determinación de productos de fermentación (AL, AA, AP y AB), nitrógeno amoniacal y N-NH₃/N-Total se realizó en un laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab, Ithaca, NY).

Los datos experimentales referentes a pH y productos de fermentación se analizaron conforme a un diseño completamente aleatorizado (DCA) con un arreglo factorial 2 x 7. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el Modelo Lineal General (GLM) de SAS. Para comparar las diferencias entre los tratamientos individuales se realizó una prueba de separación de medias TUKEY (SAS, 2004). El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

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

Donde:

Y_{ij} = variable dependiente (pH y productos de fermentación)

μ = media general estimada

α_i = efecto de tratamiento (Control e Inóculo)

β_j = efecto de días de fermentación (0, 4, 7, 14, 21, 28, 35)

$\alpha\beta_{ij}$ = interacción de ambos factores

ε_{ij} = error experimental

4.3. Estabilidad Aeróbica

Para la determinación de la estabilidad aeróbica impartida por ambos tratamientos, se abrieron microsilos de cada tratamiento por triplicado, después de 35 días de fermentación. Se colocaron 500g del ensilaje en recipientes de poliestireno, parcialmente envueltos con bolsas de plástico (Figura 5), y se expuso al aire durante cinco días. La temperatura fue revisada cada seis horas durante cinco días con termómetros colocados en la masa del ensilaje. Se determinó el pH del ensilaje después de 0, 1, 3 y 5 días de exposición aeróbica como descrito anteriormente.

Los datos experimentales para temperatura en la prueba de estabilidad aeróbica se analizaron conforme a un diseño de parcelas divididas utilizando el procedimiento de Análisis de Modelos Mixtos (proc mixed) de SAS. Las diferencias entre los tratamientos individuales se sometieron a una prueba de separación de medias “Least Square Means” (SAS, 2004). El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

Y_{ijk} = variable dependiente (temperatura)

μ = media general estimada

α_i = efecto de tratamiento (Control e Inóculo)

β_j = efecto de la hora de exposición (0, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96 y 120)

$\alpha\beta_{ij}$ = interacción de ambos factores.

ϵ_{ij} = error experimental

Los datos experimentales de pH observados en la determinación de estabilidad aeróbica se analizaron del mismo modo que los datos de temperatura, excepto que en vez de nueve horas, se utilizaron cuatro días de exposición (0, 1, 3, 5) al aire.



Figura 5: Ensilaje de GTN expuesto a condiciones aeróbicas en recipientes de poliestireno forrado con bolsas de plástico y termómetros incrustados.

4.4. Consumo Voluntario

Para determinar el CV para ambos experimentos se utilizaron, en un solo periodo, seis ovinos machos, nativos de tipo cárnico de un año de edad aproximadamente y de PV de 34.17 ± 6.94 kg. Se alojó cada cordero en una jaula provista de un comedero doble (Figura 6). Se alimentaron tres animales con cada una de las dos dietas experimentales, durante la prueba de 10 días de duración, abarcando cinco días para adaptación a la jaula, y la rutina experimental y cinco días de recolección de datos comparativos. Para la preparación de los ensilajes se llenaron manualmente 10 bolsas de plástico de 55 galones de capacidad con GTN, con adición de un inóculo (5 bolsas - T2) o sin dicha adición (5 bolsas - T1). Las bolsas se cerraron al vacío

utilizando una aspiradora y se dejaron para fermentar durante 35 días. Para ambos experimentos, una bolsa del T1 y otra del T2 aportaron ensilaje suficiente para alimentar los animales durante dos días. Ambas dietas experimentales tenían en común un 50% de heno de gramíneas tropicales naturalizadas (HGTN) y 50% de GTN fermentadas con BPAL (T2) o sin BPAL (T1). La alimentación con el ensilaje y el heno se realizó diariamente a las 6:00am, ofreciendo los dos componentes de la dieta por separado en los dos compartimientos del comedero doble a razón de 3% del PV a base seca (BS). El material rechazado fue recolectado y pesado diariamente luego de 24 horas en el comedero. Durante todo el experimento se le suministró agua *ad libitum*.

Para ambos experimentos los datos experimentales de CV se analizaron conforme a un DCA con 3 repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante el GLM de SAS y las diferencias entre los tratamientos individuales se sometieron a una prueba de separación de medias “TUKEY” (SAS, 2004). El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i$$

Donde:

Y_{ij} = variable dependiente (CV de ensilaje de GTN, CV de HGTN y CV de MST)

μ = media general estimada

α_i = efecto de tratamiento (Control e Inóculo)

ε_i = error experimental

Se calculó y expresó el CV del ensilaje también en relación al forraje ofrecido (ensilaje + heno) y en relación al ofrecimiento de ensilaje.



Figura 6: Cordero macho tipo carne en jaula con comedero doble.

5.0. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Experimento con Inóculo Comercial 1

Las GTN utilizadas en este experimento mostraron un pH inicial, media de 5.75 y contenidos porcentuales BS de: MS, 35.54; MI, 14.02; MO, 85.98 (100-MI), CSA, 0.15 y PB, 6.05. Referente a los componentes de paredes celulares se determinaron valores porcentuales de: FDN, 69.58; FDA, 51.82, hemicelulosa, 17.76 (FDN-DFA) y lignina 6.52 (Cuadro 2). Esta composición de las GTN antes de ensilarse se asemeja a las obtenidas en estudios previos con gramíneas tropicales, que se caracterizan por concentraciones bajas y variables de CSA y altas de paredes celulares (Wilkinson, 1983; Van Soest, 1994; Rodríguez et al., 2001).

Cuadro 2: pH y composición química inicial de gramíneas tropicales naturalizadas ensiladas en microsilos con y sin Inóculo Comercial 1.

Características ¹	Media	Desviación Estándar
pH	5.75	0.07
<u>Composición Química (%)</u>		
MS	35.54	0.06
MI	14.02	1.38
PB	6.05	0.86
FDN	69.58	3.05
FDA	51.82	1.34
Lignina	6.52	1.17
CSA	0.15	0.18

¹Media de 3 repeticiones.

5.1.1. pH y Productos de Fermentación

La acidez, medida inversamente por el pH fue menor, después de cuatro día de ensilamiento en GTN ensiladas sin inóculo (T1, 4.65), al compararse con el tratamiento con inóculo (T2, 4.36) (Cuadro 3). Sin embargo, ya a los siete días la situación fue al revés y la diferencia a favor de T1 fue significativa ($P < 0.05$, 4.14 vs. 4.79). No se observaron diferencias significativas en pH entre tratamientos después de los siete días de fermentación y no se mantuvo ninguna de las tempranas ventajas citadas. Se verificó una interacción de tratamiento por día ($P < 0.001$). El único caso de alcanzar el pH de 4.2, que representa la acidez recomendada para definir un ensilaje estable y de alta calidad (Breirman y Ulvelsi; citados por McCollough, 1978) fue el de T1 a los siete días de fermentación. Los resultados presentes concuerdan con los de otros

experimentos realizados con ensilamiento de gramíneas en ambiente tropical, donde se ha demostrado que la adición de inóculos de bacterias ácido lácticas disminuye el pH, durante los primeros días de la fermentación, pero este efecto desaparece después de un lapso que ha variado entre experimentos (Rodríguez, 1996).

La concentración de AL fue menor ($P<0.05$), en el ensilaje fermentado sin inóculo microbiano, (T1) a los 0 y 21 días, pero mayor ($P<0.05$) a los 7 y 14 días de fermentación relativo a T2, mientras las diferencias a favor de T2 a los 4 días y a favor de T1 a los 35 días no resultaron significativas (Cuadro 3). La interacción de tratamiento por día fue significativa ($P<0.001$). En fin, el patrón de efectos de los tratamientos fue errático. En sólo dos casos se observaron concentraciones de AL mayores de 1% (T2 a los 4 días y T1 a los 7 días). Esto contrasta con la guía de que un contenido de AL de 1.5% en BS sea considerado como el mínimo requerido en un ensilaje de alta calidad, o que da indicios de una fermentación homoláctica (Breirman y Ulvelsi; citados por McCollough, 1978). Por otro lado, Bates et al. (1989), argumentaron que la concentración ideal de AL de una buena fermentación es de aproximadamente 3.0%. Las hierbas de climas tropicales típicamente tienen menor concentración de CSA que las de clima templado, lo que no es ideal para lograr una fermentación láctica adecuada (Titterton y Bareeba, 2000). El bajo contenido de CSA y de AL, resultan en ensilajes con altos valores de pH (Vendramini et al., 2010). En la investigación de Rodríguez (1996) con ensilaje de sorgo forrajero en clima tropical, la inoculación con BPAL incrementó el contenido de AL durante los primeros 14 días de fermentación.

El contenido de AA no difirió significativamente entre ambos tratamientos a través del periodo fermentativo (Cuadro 3). Sin embargo, el efecto de días de fermentación fue significativo ($P<0.001$), en virtud de una marcada tendencia ascendente con el tiempo hasta

alcanzar concentraciones máximas de AA luego de 28 días para luego retroceder hasta el día 35. Los contenidos de AA y AL presentes, concuerdan con los de estudios previos que mostraron en ensilajes tropicales alto contenido de AA y bajo contenido de AL (Catchpoole y Henzel, 1971). La observación de Oude Elferink et al., (2000), de que *L. buchneri* tiene la habilidad de convertir el AL en AA podría explicar en parte la alta producción de AA después del día 7 y hasta el 28 de fermentación. Se ha fijado la concentración ideal de AA en ensilaje de pastos tropicales en menos de 3.0%, lo cual es ampliamente mayor que los valores presentes, pero se formó más AA que AL, tal vez por ocurrir una fermentación heteroláctica debido a la baja concentración de CSA. Vendramini et al. (2010) obtuvieron concentraciones de AL y AA parecidas a las presentes al ensilar hierbas en climas tropicales e indicaron que sería por tratarse de una fermentación heteroláctica.

Los ácidos orgánicos, AP y AB no difirieron significativamente entre tratamientos con excepción de AB a los 14 días. (Cuadro 3). La concentración de AP fue en aumento ($P < 0.001$) durante los primeros 28 días del periodo de fermentación para luego descender a los 35 días sobre todo en T1. La media de AB de 7.10% en BS representa un valor inexplicable y que excede grandemente lo recomendado de menos de un 1% (McCollough, 1978). Investigaciones más recientes indican que una alta concentración de AB en el ensilaje ($> 0.5\%$ de MS) se debe a una indeseable fermentación clostridial (Kung y Shaver, 2001). Ensilajes con alto contenido de AB son por lo general bajos en valor nutritivo y tienen niveles elevados de FDA y FDN (Cuadro 5) porque muchos de los nutrientes solubles han sido degradados y ha ocurrido pérdida de MS. Además, tales ensilajes generalmente presentan bajos niveles de energía digerible y sus proteínas están extensamente degradadas resultando en un aumento en la fracción nitrogenada no proteica. Así mismo, Kung y Stoke (2001), concluyen que altos niveles de AB presentes en los ensilajes

hechos de forrajes bajos en contenido de azúcar o demasiado húmedos (<30% de MS) y podrían ser resultado de extensa degradación de proteína. Sin embargo, estas consideraciones no bastan para justificar los exagerados niveles de AB arrojados por el análisis de los ensilajes presentes.

El contenido de N-amoniaco fue numéricamente ($P > 0.05$) menor en GTN ensiladas sin aditivo a los días 28 y 35 de fermentación (Cuadro 3). En ambos tratamientos, la concentración N-NH₃ fue prácticamente nula hasta el día 14 de fermentación para luego aumentar durante el resto del periodo de fermentación en T2 pero sólo hasta el día 21 en T1. Esto es indicativo de una mayor hidrólisis de compuestos nitrogenados en ensilaje con inóculo de BPAL pero siempre a bajo nivel en general. Según el criterio N-NH₃/N-Total, el N contribuido en forma de NH₃ llegó a constituir un máximo de 1.69% del N-Total en T1 (a los 21 días) y 3.94% en T2 (a los 35 días), sin diferencias significativas (Cuadro 3). La ausencia de evidencia de extensa degradación de la proteína de estos ensilajes no concuerda con los altos valores de AB obtenidos en el análisis químico y pone en duda los mismos.

Cuadro 3. Efecto del tratamiento y día de fermentación sobre el pH y los productos de fermentación de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 1².

Característica ¹	Día	Tratamiento		EEM ³	Probabilidad (P>F)		
		1	2		T ⁴	D ⁵	T*D ⁶
pH	0	5.77	5.68	0.008	0.033	0.001	0.001
	4	4.65	4.36				
	7	4.14 ^b	4.71 ^a				
	14	4.51	4.60				
	21	4.45	4.54				
	28	4.50	4.49				
	35	4.39	4.38				
Productos de Fermentación (%)							
Acido láctico	0	0.132 ^b	0.172 ^a	0.201	0.006	0.001	0.001
	4	0.948	1.065				
	7	1.134 ^a	0.585 ^b				
	14	0.475 ^a	0.096 ^b				
	21	0.050 ^b	0.143 ^a				
	28	0.144	0.136				
	35	0.147	0.115				
Acido acético	0	0.172	0.192	0.349	0.614	0.001	0.506
	4	0.390	0.471				
	7	0.404	0.416				
	14	0.552	0.636				
	21	0.591	0.655				
	28	1.702	1.499				
	35	1.086	1.059				
Acido propiónico	0	0.000	0.003	0.023	0.518	0.001	0.891
	4	0.007	0.006				
	7	0.028	0.021				
	14	0.077	0.118				
	21	0.114	0.085				
	28	0.231	0.229				
	35	0.142	0.203				
Acido butírico	0	0.034	0.484	0.948	0.946	0.001	0.681
	4	0.887	1.041				
	7	2.772	2.894				
	14	6.708 ^b	10.272 ^a				
	21	9.114	7.672				
	28	17.278	18.074				
	35	12.946	15.352				
N-NH ₃	0	0.000	0.000	0.003	0.113	0.208	0.807
	4	0.000	0.000				
	7	0.002	0.000				
	14	0.002	0.000				
	21	0.014	0.013				
	28	0.013	0.020				
	35	0.011	0.033				
NH ₃ /N-Total	0	0.000	0.000	3.704	0.469	0.285	0.807
	4	0.000	0.000				
	7	0.237	0.000				
	14	0.197	0.000				
	21	1.694	1.615				
	28	1.536	2.364				
	35	1.340	3.940				

¹ Media de 3 repeticiones.

² Medias con diferentes letras en la misma fila tienen diferencia significativa bajo la prueba de Tukey.

³ Error estándar de las medias.

⁴ Efecto de tratamiento. (1= Control, 2= Inóculo)

⁵ Efecto de día de fermentación.

⁶ Interacción entre tratamiento y día de fermentación.

5.1.2. Estabilidad Aeróbica

El deterioro aeróbico de ensilajes ocurre debido al metabolismo de azúcares residuales y ácidos orgánicos por microorganismos (e. g. bacterias aeróbicas, levaduras, hongos) y este puede ser detectado por aumentos en temperatura y pH (Spolestra et al., 1988). En el experimento presente, se observó un aumento en el pH ($P < 0.05$) en ensilajes inoculados con BPAL y expuestos a condiciones aeróbicas durante cinco días (de 4.38 a 4.55) y al compararse con ensilajes sin aditivo hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) a los 3 y 5 días (Cuadro 4). Si bien, los cambios decrecientes en la acidez fueron de pequeña magnitud se verificaron efectos significativos de tratamientos ($P < 0.015$) y día de fermentación ($P < 0.022$) mientras la interacción de tratamiento por día se acercó a la significación ($P < 0.061$).

La temperatura de los ensilajes expuestos al aire no demostró diferencias entre tratamientos ($P > .05$), pero sí las hubo entre horas ($P < 0.001$), pero limitadas mayormente a cambios ocurridos durante las primeras 12 horas (Cuadro 4). En fin, el ensilaje de GTN producido bajo ambos tratamientos fue estable durante cinco días de ser expuesto a condiciones aeróbicas. En un estudio previo, se observó, que la adición de inóculos bacterianos, mejoró las características fermentativas, pero no la estabilidad del ensilaje cuando se comparó con ensilajes sin aditivos (Rodríguez, 1996). Esto difiere de los resultados presentes en el primer punto pero concuerda con respecto al segundo. Sin embargo, en ese estudio se utilizó sorgo forrajero un forraje con alto contenido de CSA y menor contenido de paredes celulares que las GTN.

Lindgern et al. (1985) encontraron que en ambientes templados forrajeras ensiladas con inóculos microbianos conteniendo bacterias ácido lácticas mostraron fermentación homoláctica predominantemente. Esto reduce las pérdidas energéticas durante la fase de almacenamiento,

pero puede aumentar el deterioro, una vez el ensilaje se expone al aire. Rust et al. (1989), señalaron que el aumento en la producción de AL mediante fermentaciones homoláctica podría resultar en ensilajes menos estables aeróbicamente. Pitt et al. (1991), demostraron que el AA y AP tienen propiedades bacteriostáticas o micostáticas, por lo cual pueden contribuir a la estabilidad aeróbica de los ensilajes. Kung y Stokes (2001), comentan que un ensilaje con alto contenido de AB, podría ser muy estable cuando se expone al aire aunque tenga un pH bastante alto. Por otro lado, Kung (2005) argumenta que el AB causado por la actividad de clostridios es uno de los agentes de mayor actividad anti-hongos producidos en el ensilaje. Asimismo, los ensilajes con bajo contenido de AL, pero un contenido de AA mayor de 1%, son indicativos de fermentaciones pobres pero pueden ser estables a condiciones aeróbicas.

Cuadro 4. Efecto del tratamiento y día de exposición aeróbica sobre el pH y la temperatura de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial ¹.

Característica ¹	Tratamientos		EEM ³	Probabilidad (P>F)			
	1	2		T ⁴	D ⁵	T*D ⁶	
(Día)							
pH	0	4.40	4.38	0.003	0.015	0.022	0.061
	1	4.50	4.50				
	3	4.39 ^b	4.52 ^a				
	5	4.42 ^b	4.55 ^a				
<u>Temperatura C°</u> (Hora)							
	0	25.56	26.11	0.592	0.165	0.001	0.922
	6	26.48	26.48				
	12	27.22	27.22				
	24	27.41	27.41				
	30	27.41	27.41				
	48	27.22	27.41				
	72	27.22	27.59				
	96	27.41	27.41				
	120	27.41	27.22				

¹ Media de 3 repeticiones en Base Seca.

² Medias con diferentes letras en la misma fila tienen diferencia significativa bajo la prueba de Tukey.

³ Error estándar de las medias.

⁴ Efecto de tratamiento. (1= Control, 2= Inóculo)

⁵ Efecto de día de fermentación/hora de exposición aeróbica.

⁶ Interacción entre tratamiento y día de fermentación/hora de exposición aeróbica.

5.1.3. Consumo Voluntario

Se observó, un mayor consumo total (CT) y consumo de ensilaje (CE) en el tratamiento con aditivo (Figura 7) por márgenes de 154.3 y 178.3 g/d, respectivamente. Al contrario, el consumo de heno (CH), fue 24.1 g/d menor en el tratamiento inoculado relativo al control (563.8 vs. 587.9 g/d) aunque las diferencias entre tratamientos no fueron significativas. La observada disminución en el CE relativo al CH no tiene una explicación obvia en ausencia de datos específicos sobre los productos de fermentación en los ensilajes usados en esta prueba in vivo. Aunque no se dispone de dichos datos en estos ensilajes los resultados, en la media en que podrían ser aplicables, obtenidos con microsilos no revelaron indicios de composición química problemática para un buen CV. Kung y Stokes (2001) asociaron ensilajes con altas cantidades de AA y AB con bajos consumos de MS. Kung y Shaver (2001), señalaron que altas concentraciones de amoníaco y de AB suelen ser de baja aceptación animal, pero esto puede deberse a la presencia de concentraciones significativas de otros productos de la descomposición, tales como aminas, que reducen el consumo del animal. Church et al. (2002), concluyeron que un alto pH junto con un alto porcentaje de AB, crea condiciones óptimas para la proliferación de ciertos tipos de clostridios. Estos clostridios fermentan compuestos de NNP, con liberación de amoníaco y la formación de olores desagradables (a podrido) y posiblemente toxicidad. Buchanan-Smith (1990), concluyó que un ensilaje con alto porcentaje de AA (>1%) sin incrementos en los valores de otros constituyentes, reduce la palatabilidad y por lo tanto el CV.

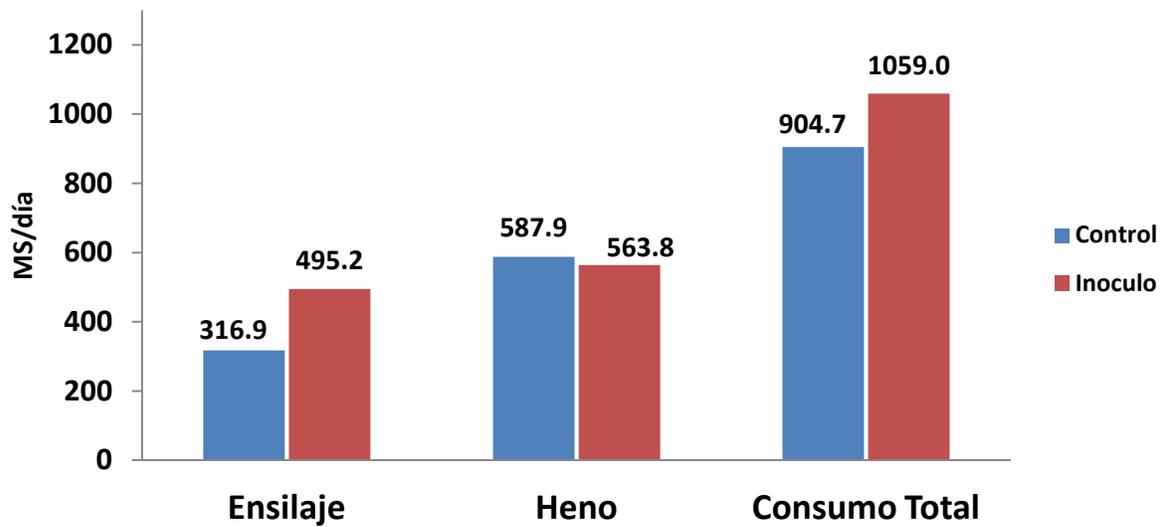


Figura 7: Consumo total e individual de ensilaje con o sin Inóculo Comercial 1 y heno de gramíneas tropicales naturalizadas

La relación de ensilaje consumido a ensilaje ofrecido (CE/EO) fue mayor para el tratamiento inoculado (97.45%) comparado con el tratamiento sin inocular (62.85%), lo que indica una mejor aceptación por parte de los animales con ensilaje inoculado versus el no inoculado (Figura 8). También la relación de CE/CT fue mayor para el tratamiento con inoculación (46.79%) que en el ensilaje sin inocular (34.55%), lo que constituye otro criterio indicativo de la relativa aceptación animal en ambos casos.

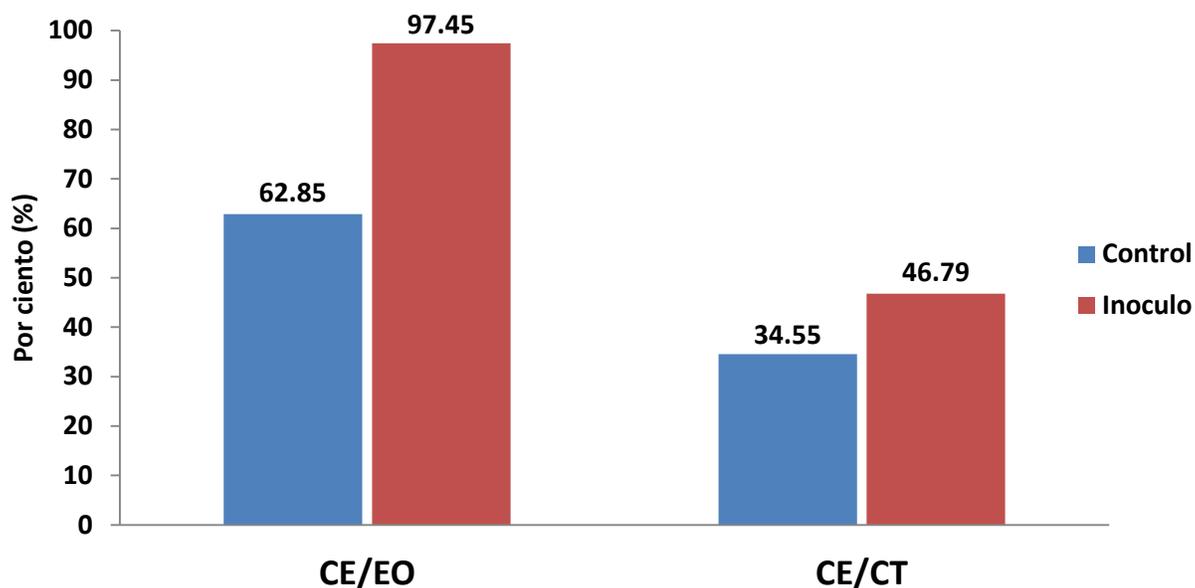


Figura 8: Relación del consumo de ensilaje GTN con o sin Inóculo Comercial 1 (CE) con el ensilaje ofrecido (EO) y con el consumo total (CT) expresados como porcentaje.

5.2. Experimento con Inóculo Comercial 2

En este estudio las GTN usadas tuvieron un pH media inicial de 6.10 y contenidos porcentuales BS de: MS, 25.78; MI 15.15 MO, 84.85 (100-MI); CSA 0.53; PB, 6.67; FDN, 67; FDA, 52.90; Hemicelulosa, 14.10 (FDN-FDA) y lignina 7.47 (Cuadro 5).

Una comparación del pH y la composición química inicial de las GTN de ambos experimentos, indica que las GTN del experimento 1 tuvieron un pH más bajo (5.75) con una diferencia de 0.35 unidades en la escala de pH. Las GTN del experimento 1, también tenían mayor contenido de MS (35.53%) superando el valor del experimento 2 por casi 10 unidades porcentuales. Van Soest (1994), argumenta que el porcentaje recomendable de MS en un forraje para ensilar fluctúa entre de 25 a 35% de modo que el valor observado en este caso podría ser justamente adecuado o posiblemente marginalmente inadecuado. Sin embargo, los contenidos

iniciales de MI, PB, FDN, FDA y lignina fueron similares en BS en ambos experimentos. Resultó sorprendente el contenido de MI tan alto y hasta un poco más en este caso que en el primer experimento, en ausencia de obvia contaminación de GTN con el suelo en el segundo experimento. El contenido de CSA fue mayor en el segundo que en el primer experimento (0.53 vs 0.15%), pero ambos valores están bastante por debajo del contenido ideal (3%) (Wilkinson citado por Church et al. 2002).

Cuadro 5: pH y composición química inicial de gramíneas tropicales naturalizadas ensiladas con y sin Inóculo Comercial 2.

Características ¹	Media	Desviación Estándar
pH	6.10	0.07
<u>Composición Química (%)</u>		
MS	25.78	0.32
MI	15.12	0.63
PB	6.67	0.25
FDN	67.00	1.27
FDA	52.90	0.40
Lignina	7.47	0.66
CSA	0.53	0.20

¹ Media de 3 repeticiones.

5.2.1. pH y Productos de Fermentación

Las GTN ensiladas con adición del Inóculo Comercial 2 demostraron valores de pH menores durante todo el proceso de ensilamiento ($P > 0.05$) y una media menor ($P < 0.0001$), de 5.23 en comparación con el de T1 (control) de 5.57. Aun así hubo variación suficiente para

resultar en una interacción de tratamiento por día de fermentación ($P=0.008$) En ambos tratamientos el pH disminuyó progresivamente al transcurrir los 35 días de fermentación ($P < 0.001$) (Cuadro 6) y la diferencia entre los dos tratamientos se ensanchaba. Ninguno de los tratamientos logró ensilaje con pH menor o igual a 4.2, el pH recomendado para definir un ensilaje como estable; el valor final de T2 (4.77) empezó a acercarse a dicha meta, pero le quedó más lejos que los pH finales obtenidos con los ensilajes en el experimento anterior (4.39 y 4.38). Esto podría ser producto del mayor contenido inicial de MS en la GTN ensilada en ese caso.

El T2 demostró una temprana ventaja en la concentración de AL ($P < 0.05$) a los 4 y 7 días de fermentación respecto al control, pero no subió más que a 0.554% para luego disminuir abruptamente y seguir con un valor inferior al de T1 durante el resto del periodo de fermentación con excepción del día 21, resultando en una interacción de tratamiento por día de fermentación ($P=0.002$). El hecho que la media de T2 (0.26%) superó ($P < 0.05$) el de T1 (0.10%) no es muy ilustrativo. En ambos tratamientos, el porcentaje de AL disminuyó después del día 7 de fermentación, probablemente debido a la falta de carbohidratos para las BPAL. Otro factor contribuyente podría ser la utilización de AL como sustrato por partes de otras integrantes de la microflora. En experimentos relacionados, Rodríguez (1996) encontró que inocular sorgo forrajero con BPAL, incrementó la concentración de AL en los primeros 14 días de fermentación.

En el tratamiento con el inóculo comercial, durante los primeros siete días de fermentación, el pH disminuyó de 6.04 a 5.02 al comparar con el tratamiento sin inocular que descendió de 6.15 a 5.49. Durante estos mismos días de fermentación de la GTN inoculada, el porcentaje de AL aumentó de 0.02% hasta 0.55%, lo que podría ser la causa principal de este

descenso de pH del T2. Por contraste, en el T1 sin inocular el porcentaje de AL sólo aumentó de 0.02 a 0.12 durante el mismo lapso de fermentación.

El contenido de AA (Cuadro 6) aumentó progresivamente durante los primeros 28 días del periodo de fermentación ($P < 0.001$), y hubo diferencia a favor del tratamiento control sobre T2 a partir del día 14 y hasta el día 35 de fermentación, cuando alcanzó significación (0.59 vs. 0.28%) ($P < 0.05$). Ambos tratamientos resultaron en contenidos de AA por debajo del nivel de 1% que podría aportar algo de importancia a la preservación del ensilaje.

La comparación de medias de contenido de AP favoreció ($P = 0.0002$) al tratamiento control (sin inóculo) sobre T2 (0.11 vs. 0.04%). Al transcurrir los días de fermentación, el contenido de AP aumentó ($P < 0.05$) en ambos tratamientos, pero siempre con ventaja de T1 sobre T2 y sólo en el T1 sobrepasó el límite recomendado en ensilajes de gramíneas por Kung y Stokes, (2001) ($< 0.1\%$ / BS). Referente al contenido de AB, se observó un aumento progresivo ($P < 0.001$) a través del periodo fermentativo en los ensilajes de ambos tratamientos. A los cuatro días de fermentación se obtuvo una diferencia ($P < 0.05$) a favor de T1 (0.216 vs. 0.047%) mientras que a los 35 días el T2 tuvo mayor valor (0.854 vs 0.688) de modo que el efecto de tratamiento fue indecisa y no significativa ($P = 0.651$) y se verificó una interacción ($P < 0.032$) de tratamiento por día de fermentación (Cuadro 6). Estos resultados analíticos referentes a AB son mucho más razonables que los obtenidos en el primer experimento. McCollough (1978) recomendó un nivel de AB de menos de 1% en BS en los buenos ensilajes. Investigaciones más recientes (Kung y Shaver, 2001) señalan que una alta concentración de AB ($> 0,5\%$ en BS) indica que el ensilaje ha experimentado una fermentación clostridial indeseable y tendrá elevados niveles de FDA y FDN porque muchos de los nutrientes solubles han sido degradados con consecuente pérdida de valor nutritivo. Kung y Stokes (2001) argumentan que el contenido de

AB debe ser indetectable en buenos ensilajes de maíz y alfalfa mientras el contenido de AA debe fluctuar entre 1 hasta 3%. En cambio los altos niveles de AA (> 3 a 4%) o AB (> 0,5%) en cualquier tipo de ensilaje son indicadores de fermentación menos deseable.

El contenido porcentual de NH_3 difirió entre tratamientos ($P = 0.0204$) con medias globales de 0.0234 para T1 (no inoculado) y 0.0155 para T2. Se observó, para ambos tratamientos un aumento temprano ($P < 0.05$) en de NH_3 hasta el día 4 de fermentación y luego un descenso continuo hasta el día 35 con excepción de día 14 en T2. La $\text{N-NH}_3/\text{N-Total}$ fue menor ($P=0.0216$) en ensilaje inoculado que en el control, 1.83 vs. 2.75 %. Estas cifras indican que hubo una baja degradación de proteínas a NH_3 , aunque el forraje tenía un bajo contenido inicial de las mismas (Cuadro 5). En el ensilaje de maíz, la NH_3 normalmente constituye entre el 5 y el 7% de la PB pero tiende a ser más alta (10 a 15%) en ensilaje de gramíneas y alfalfa (Kung y Stokes, 2001).

Al comparar ambos experimentos referentes a algunos de los ácidos orgánicos presentes en los ensilajes, como AL y AA, se nota diferencias importantes. Las GTN ensiladas con inoculo (T2), presentaron mayores porcentajes de AL y AA en el primer experimento que en el segundo (0.33 y 0.61 vs 0.19 y 0.22 respectivamente). En ambos experimentos el contenido de AP y NH_3 en los ensilajes fue similar. Estas diferencias en concentraciones de los ácidos orgánicos, no reflejan el mayor contenido inicial de CSA en la GTN del segundo experimento, sino más bien el mayor contenido inicial de MS en las GTN del primer experimento.

Cuadro 6. Efecto del tratamiento y día sobre el pH y los productos de fermentación de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 2².

Característica ¹	Día	Tratamiento		EEM ³	Probabilidad (P>F)		
		1	2		T ⁴	D ⁵	T*D ⁶
pH	0	6.15	6.04	0.073	<.001	<.001	0.008
	4	5.55 ^a	5.32 ^b				
	7	5.49 ^a	5.02 ^b				
	14	5.56 ^a	5.25 ^b				
	21	5.57 ^a	5.21 ^b				
	28	5.45 ^a	4.98 ^b				
	35	5.21 ^a	4.77 ^b				
<u>Productos de Fermentación (%)</u>							
Acido láctico	0	0.020	0.021	0.101	<.001	<.001	0.002
	4	0.148 ^b	0.426 ^a				
	7	0.127 ^b	0.554 ^a				
	14	0.083	0.049				
	21	0.015	0.049				
	28	0.160	0.124				
	35	0.206	0.123				
Acido acético	0	0.037	0.042	0.126	0.012	<.001	0.265
	4	0.199	0.124				
	7	0.212	0.214				
	14	0.324	0.180				
	21	0.239	0.268				
	28	0.646	0.484				
	35	0.595 ^a	0.278 ^b				
Acido propiónico	0	0.000	0.008	0.003	0.002	0.001	0.400
	4	0.078	0.004				
	7	0.098	0.012				
	14	0.112 ^a	0.029 ^b				
	21	0.071	0.052				
	28	0.196 ^a	0.074 ^b				
	35	0.168	0.082				
Acido butírico	0	0.000	0.000	0.020	0.651	<.001	0.032
	4	0.216 ^a	0.047 ^b				
	7	0.180	0.140				
	14	0.487	0.404				
	21	0.746	0.386				
	28	0.743	0.671				
	35	0.688 ^b	0.854 ^a				
NH ₃	0	0.018	0.017	0.001	0.020	0.002	0.807
	4	0.035	0.024				
	7	0.030	0.015				
	14	0.029	0.029				
	21	0.022	0.014				
	28	0.021	0.007				
	35	0.007	0.000				
NH ₃ /N-Total	0	2.128	2.051	1.500	0.021	0.002	0.796
	4	4.237	2.871				
	7	3.560	1.879				
	14	3.431	3.505				
	21	1.696	2.550				
	28	2.530	0.855				
	35	0.859	0.000				

¹ Media de 3 repeticiones en Base Seca.

² Medias con diferentes letras en la misma fila tienen diferencia significativa bajo la prueba de Tukey.

³ Error estándar de las medias.

⁴ Efecto de tratamiento. (1= Control, 2= Inóculo)

⁵ Efecto de día de fermentación.

⁶ Interacción entre tratamiento y día de fermentación.

5.2.2. Estabilidad Aeróbica

Al exponer los ensilajes de GTN a condiciones aeróbicas durante cinco días, se registró un pH más ácido ($P < 0.05$) en T2 que en T1 a cada uno de los cuatro días de observación. Además se observó una tendencia a valores ascendientes con el tiempo en ambos tratamientos, pero la tendencia más acentuada en T2 que en T1 fue suficiente para producir una interacción ($P < 0.045$) entre tratamiento y día de exposición (Cuadro 7). En la temperatura de los ensilajes expuestos al aire no se encontró diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$), pero sí un efecto de las horas de exposición aeróbica ($P < 0.001$) (Cuadro 7). Es notable que los dos tratamientos cambiaron de orden (mayor o menor) cinco veces durante las nueve observaciones sin resultar en una interacción significativa entre tratamiento y hora ($P = 0.193$). Las temperaturas finales representan aumentos netos sobre los iniciales de sólo 0.93 y 1.67°C en T1 y T2 respectivamente. La buena estabilidad aeróbica de los ensilajes de ambos tratamientos podría deberse en parte a sus contenidos de ácidos orgánicos, AA, AP, AB, pero probablemente habrá otros compuestos no analizados involucrados. Los cambios mínimos en pH y temperatura en ambos tratamientos, son típicos de ensilajes de hierbas tropicales (Rodríguez, 1996).

A partir de los estudios con ensilajes inoculados con diferentes bacterias ácido lácticas, homo y heterofermentativas, Danner et al. (2003) concluyeron que la estabilidad aeróbica del ensilaje es determinada solamente por la concentración de AA. Este ácido actúa como un inhibidor del crecimiento de microorganismos causantes de deterioro aeróbico. Semejante propiedad posee el AP (Merry y Davies, 1999). Danner et al. (2003), observaron que la adición de AA amortiguado, no influyó sobre el pH del ensilaje, pero aumentó la estabilidad aeróbica y que la adición de AA puro, sí hizo bajar el pH y también resultó en un claro aumento de la estabilidad aeróbica. Queda fuera de duda la eficacia preservativa del AA en los ensilajes. Según

los citados autores la estabilidad aeróbica del ensilaje a un pH constante depende sólo del tipo y concentración de los ácidos orgánicos.

Si bien esta investigación no se diseñó para comparar los dos aditivos de BPAL, es relevante notar que al comparar la EA de los ensilajes de T2 de ambos experimentos, durante cinco días de exposición, el pH subió finalmente a 5.32 en el segundo experimento contra 4.55 en el primero. Las cifras correspondientes de temperatura del ensilaje a cinco días de exposición muestran escasa diferencia (27.41 vs 27.22 °C). Los ensilajes control (T1) mostraron valores de pH a los cinco días de exposición aeróbica de 5.59 y 4.42 en el presente y el anterior experimento, mientras las temperatura finales fueron 27.22 y 27.41 °C, respectivamente. En ningún de los dos casos se nota mucho efecto de los inóculos sobre la EA.

Cuadro 7. Efecto del tratamiento y día de exposición aeróbica sobre el pH y la temperatura de GTN ensiladas con y sin Inóculo Comercial 2.

Característica	Tratamientos		EEM	Probabilidad (P>F)			
	1	2		T	D	T*D	
	(Día)						
pH	0	5.21 ^a	4.77 ^b	0.0070	<.0001	<.0001	0.0446
	1	5.34 ^a	4.82 ^b				
	3	5.40 ^a	5.14 ^b				
	5	5.59 ^a	5.32 ^b				
	<u>Temperatura C°</u> (Hora)						
	0	26.29	25.74	0.2054	0.6213	<.0001	0.1929
	6	26.66	26.85				
	12	27.96	27.96				
	24	28.52	27.77				
	30	27.41	26.66				
	48	26.66	26.48				
	72	26.85	27.04				
	96	27.04	26.66				
	120	27.22	27.41				

¹ Media de 3 repeticiones.

² Medias con diferentes letras en la misma fila tienen diferencia significativa bajo la prueba de Tukey.

³ Error estándar de las medias.

⁴ Efecto de tratamiento. (1= Control, 2= Inóculo)

⁵ Efecto de día de fermentación/hora de exposición aeróbica.

⁶ Interacción entre tratamiento y día de fermentación/hora de exposición aeróbica.

5.2.3. Consumo Voluntario

En la evaluación de los forrajes “*in vivo*”, se observó un mayor CT ($P>0.05$) de parte de los corderos de T1 alimentados con el ensilaje control y HGTN versus los de T2, que recibieron el ensilaje inoculado y HGTN, por un margen de 109.7 g/d (1172.3 vs. 1062.6 g/d) (Figura 9). Al igual que en el primer experimento, el CH fue mayor que el CE, pero la diferencia en CH entre tratamientos fue de sólo 19.7 g/d ($P>0.05$). El CE obtenido en el tratamiento control fue 90.0 g/d mayor que el del ensilaje inoculado (525.3 vs 435.3 g/d), aunque ninguna de estas diferencias fue significativa.

Comparando ambos experimentos, el CV de ensilaje de GTN con inóculo (T2) fue mayor en el experimento 2 (525.3 g/d) versus el experimento 1 (495.2 g/d). Relativo a sus respectivos controles (T1) el CE de T2 lo superó por 43.8% en la primera oportunidad, mientras al contrario en la segunda quedó superado por 17.1% (Figura 7 y 9).

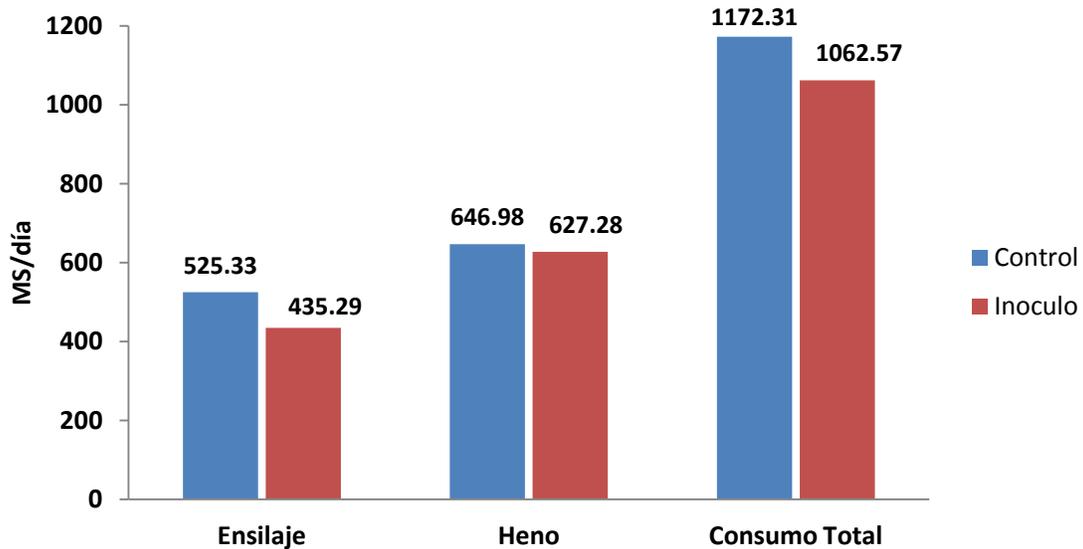


Figura 9: Consumo total e individual de ensilaje con o sin Inóculo Comercial 2 y heno de gramíneas tropicales naturalizadas.

La relación de CE/EO fue mayor en el caso del control sin inocular (92.24 %) comparado con el T2 con ensilaje inoculado (78.25%). Esto indica una mejor aceptación animal del primero (Figura 9). La relación de CE/CT también fue menor para el ensilaje inoculado (40%) relativo al ensilaje sin inocular (44.8%), lo que añade evidencia en apoyo de la mejor aceptación animal del ensilaje control en este experimento (Figura 10).

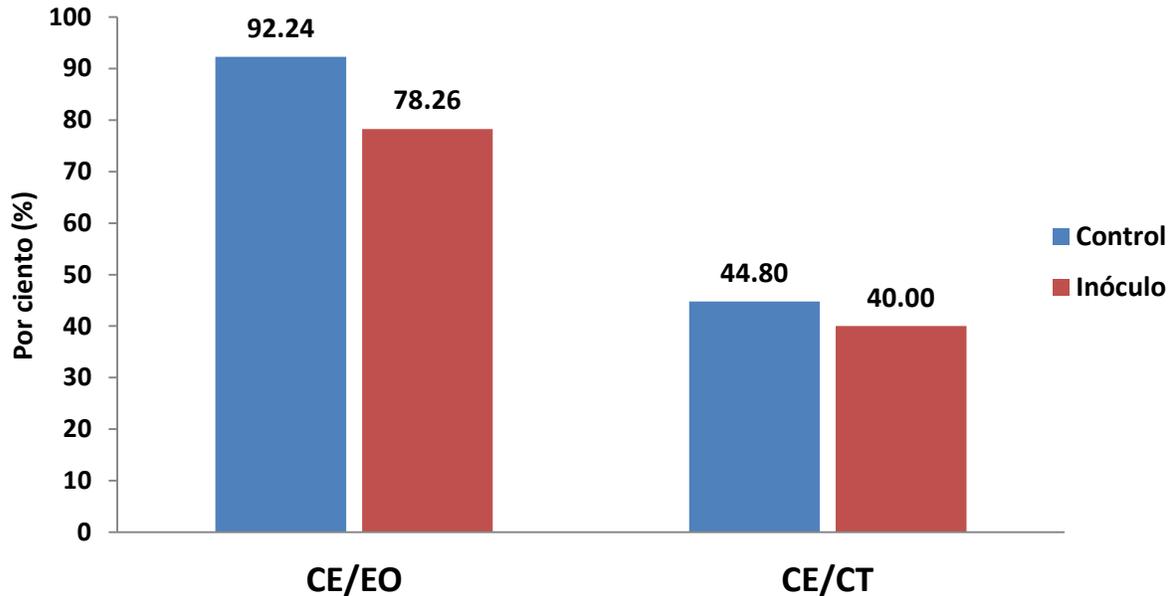


Figura 10: Relación del consumo de ensilaje de GTN (CE) con o sin Inóculo Comercial 2 (CE) con el ensilaje ofrecido (EO) y con el consumo total (CT) expresadas como porcentajes.

6.0. CONCLUSIONES

Experimento 1:

- La utilización de Inóculo Comercial 1 no mejoró las características fermentativas del ensilaje de GTN preparado en microsilos.
- Ambos ensilajes fermentados en microsilos con y sin la adición de inoculo de BPAL, se mostraron estables a condiciones aeróbicas durante 5 días de exposición.
- No hubo diferencias significativas en CE, CH ni CT (ensilaje más heno) entre los tratamientos, pero el CV del ensilaje con inóculo llevó una ventaja numérica y también relativo al ofrecimiento del mismo (CE/EO) fue mayor (97.45%) vs el ensilaje control (62.85%).

Experimento 2:

- La adición del Inóculo Comercial 2 mejoró las características fermentativas del ensilaje en microsilos en términos de una mayor disminución del pH, pero el aumento en la concentración de AL, que ocurrió durante los primeros 7 días de fermentación no persistió.
- Ambos tratamientos rindieron ensilajes en microsilos estables a condiciones aeróbicas.
- Al ofrecer a los ovinos dietas con 50 % de HGTN y 50 % de ensilaje de GTN fermentado con o sin inóculo por 35 días, hubo un mayor CV de HGTN que de las GTN fermentadas, mientras las diferencias en CH, CE y CT a favor del testigo fueron relativamente pequeñas.

7.0. IMPLICACIONES

En esta investigación se logró la producción de buen ensilaje de GTN en microsilos y en mayor cantidad en bolsas de plástico sin el uso de aditivo alguno, a juzgar por los resultados de pH (experimento 1), EA y CV, aun cuando en experimento 2, al ensilar GTN más húmedas, el pH y contenido de AL indicaran una situación no tan ideal. Frente al aparente éxito de los ensilajes control, tal vez sería difícil que un inóculo de BPAL cualquiera lograra un impacto muy grande para mejorar el ensilaje. El inóculo evaluado en el 1^{er} experimento mostró algún efecto beneficioso sobre el CV de ensilaje y MST, mientras el inóculo del 2^{do} experimento mejoró el pH del ensilaje. Estos pueden considerarse los resultados más positivos referentes al uso de los inóculos, pero no se trata de grandes efectos. Uno se podría preguntar si ¿esta línea de investigación con GTN, conducirá a beneficios prácticos a nivel de fincas comerciales o vaquerías en Puerto Rico algún día? En teoría añadir BPAL no debe tener mucho efecto en ausencia de CSA suficiente para promover su actividad.

8.0. REFERENCIAS

- Adesogan, A. T. 2006. Factors affecting corn silage quality in hot and humid climates. In 17th Florida Ruminant Nutrition Symposium. University of Florida. Gainesville. pp 108-127.
- 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 bermudagrass. *J. Dairy Sci*, 87:3407-3416.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1991. Official methods of analysis, 13th ed. Washington, D. C.
- Bates, D. B., W. E. Kunkle, C. G. Chambliss, and R. P. Cromwell. 1989. Effect of dry matter and additives on bermudagrass and rhizoma peanut round bale silage. *J. Prod. Agric.* 2:91.
- Beck, T. 1978. Fermentation of Silage – a Review. M.C. Mc Cullough, (Ed). National Feed Ingredients Association, West Des Moines, IA. pp. 117-179.
- Bolsen, K.K. 1999. Silage management in North America in the 1990s. *In*: T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds) *Biotechnology in the Feed Industry*. Proc. of the 15th. Annual Symposium. Nottingham, UK: Nottingham Univ. Press. p. 233-244.
- Buchanan-Smith, J.G. 1990. An investigation into palatability as a factor responsible for reduced intake of silage by sheep. *Anim. Prod.*, 50: 253-260.
- Cai, G., B. Jin, C. Saint and P. Monis. 2011. Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. *J. Biotech.* 155, (3): 268-274.
- Canzi, E., E. DelPuppo, T. Brusa, E. Galli and A. Ferrari. 1993. Influence of oxygen on growth and fermentation activity of propionic acid bacteria. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 43(1):147-157.
- Catchpoole, V.R. and E. F. Henzell. 1971. Silage and silage making from tropical herbage species. *Herbage Abst.* 41:3.
- Charley, R. 2006. Key Silage Management Topics. Lallemand Animal Nutrition. Milwaukee, WI. pp 13-19.
- Church, D.C., W.G. Pond and K.R. Pond, 2002. Fundamentos de nutrición y alimentación animal. 2nd ed. Editorial Limusa, S.A. Mexico. pp 335-340
- Contreras, F. E. and R.E. Muck,. 2006. Microbial Inoculants for Silage. Focus on Forage, University of Wisconsin Board of Regents, Vol 8: No.4. p.1-4.

- Contreras, F.E., M.A. Marsalis, y L.M. Lauriault. 2009. Inoculantes microbiales para ensilaje: Su uso en condiciones de clima cálido. Servicio de Extensión Cooperativa, Facultad de Ciencias Agrícolas, Ambientales y del Consumidor. NM State University. Circular 642 (español).
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber and R. Braun. 2003. Acetic acid increases stability of silage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1):562.
- Filya, I., 2003. The Effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *J. Dairy Sci.* 86:3575–3581.
- Gibson, T., A.C. Stirling, R.M. Keddie, and R.F. Rosenberger. 1958. Bacteriological changes in silage made at controlled temperature. *J. Gen. Microbiol.* (19):112.
- Givens, D.J., A.R. Moss, and A.H. Adamson. 1993. The digestibility and energy of badly preserved grass silages. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 42: 97-107.
- Henderson, A.R, P. McDonald, and D. Anderson . 1982. The effects of a cellulase preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during ensilage of grass, lucerne, and clover. *J. Sci. Food Agric*, 33:16-20.
- Higginbotham, G.E, S. C. Mueller, K. K. Bolsen, and E. J. DePeters. 1998. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *J Dairy Sci* 81:2185–2192.
- Honning, H. and M.K. Woolford. 1979. Change in silage on exposure to air. In: C. Thomas. (Ed). *Forage Conservartion in the 80's*. Br. Grass. Soc. Ocaccional Symp. No 11, Brighton, U.K.
- 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 Sei.* 92:690-697.
- 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.
- Kung, J.R., 2005. *Aerobic Stability of Silages*. Proc. of the Conference on Silage for Dairy Farms. Harrisburg, PA.
- Kung, L. and R. Shaver. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Wisconsin Forage Team, *Focus on Forage* 13 (13):20-28.

- Kung, L. and M. R. Stokes, 2001. Analysing Silage for Fermentation End Products.
http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/articles/analyzing_silages_for_fermentati.htm
- Lindgren, S. E, K. Petterson, A. Johnson, P.Linguall, and A. Kaspersson. 1985. Silage inoculation- selected strain, temperature, wilting and practical applications. Swed. J. Agric. Res. 15;19.
- Martinez, J.L. 1998. Efecto de la aplicación de aditivos comerciales sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de forrajeras ensiladas en ambientes tropicales. M.S.Tesis, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez.
- Martinez J.L, A.A. Rodríguez, F. Arias, R. Macchiavelli y E. Riquelme. 1999. Características fermentativas y estabilidad aeróbica de sorgo granifero (*Sorghum bicolor*) ensilado en Puerto Rico bajo varias dosis de inculo comercial. J. Agric. Univ. P.R. 83 (3-4): 135-151.
- McCullough, M. E. 1978. Silage: some general considerations. In: M.E. McCullough (Ed). Fermentation of silage- A Review. National Feed Ingredients Association. West Des Moines, IA. pp 3-28.
- McDonald, P., A.R. Henderson, and S.J. Heron. 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd ed. Cholcombe Publ. Cambriam Printers Ltd., Aberystwyth, U.K. pp 184-236.
- McLeod, D.S., R. J. Wilkins, and W. F. Raymond. 1970. The voluntary intake by sheep and cattle of silages differing in free-acid content. J. Agric. Sci, 75: 311-319.
- Merry, J. and D.R. Davies. 1999. Propionibacteria and their role in the biological control of aerobic spoilage in silage. A Review. Inra. Elsevier, *Lait*. 79: 149-164.
- Muck, R.1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. J. Dairy Sci. 71: 2992-3002.
- Muck, R. 1993. The role of silage additives in making high quality silage. In: Silage Production from Seed to Animal. Proc. Nat. Silage Prod. Conf. Syracuse, NY, pp. 106.
- Muck, R. E., L.E. Moser, and R.E. Pitt. 2003. Postharvest factors affecting ensiling. In D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (Eds.), *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy. Madison, WI: pp. 251–304
- Muck, R. and R.E. Pitt 1993. Ensiling and its effects on crop quality. In: Silage Production; from seed to animal. Proc. Nat. Silage Prod. Conf. Syracuse, NY. pp. 57
- Namihira, T., N. Shinzato, H. Akamine, H. Maekawa, and T. Matsui. 2009. Influence of nitrogen fertilization on tropical-grass silage assessed by ensiling process monitoring using chemical and microbial community analyses. J. Appl Microbiol. (108): 1954-1965.

- Nout, M.J.R. and F.M. Rombouts. 1992. Fermentative preservation of plants food. *J. Appl. Bact.*73 (Suppl): 136S-147S.
- Ojeda, F., 1988. Valor nutritivo de forrajes tropicales conservados como ensilajes. *Pastos y Forrajes. EEPF "Indio Hatuey"* 11:199-205.
- Oude Elferink, S.J.W.H., J. Krooneman, J.C. Gottschal, S.F. Spoelstra, F. Faber and F. Driehuis. 2000. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, (1): 125-132.
- Oude Elferink, S.J.W.H., F. Driehuis, J.C. Gottschal, and S.F. Spoelstra. 2001. Estudio 2. Los Procesos de Fermentacion del Ensilaje y su Manipulacion. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Institute for Animal Science and Health and Dept. of Microbiology, Groningen State University, Holanda p.17-30.
- Pitt, R.E. 1990. Silage and hay preservation. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Ithaca, NY. NRAES-5. pp 12-34.
- Pitt, R. E., R. E. Muck, and N. B. Pickering. 1991. A model of aerobic fungal growth in silage. 2. Aerobic stability. *Grass Forage Sci.* 46:301.
- Playne, M.J. and P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and silage. *J. Sci. Food Agric.* 17: 264-268.
- Ranjit, N.K. and L. Kung, Jr. 2000. The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J Dairy Sci.* 83:526–535.
- Rodriguez, A.A. 1996. Studies on the efficiency 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 forage ensiled in temperature and tropical environments. Ph. D. Dissertation, Michigan State University. East Lansing, MI.
- Rodríguez, A., J. Martínez, R. Macchiavelli, y E. Riquelme. 2001. Sucesión microbiana, productos de fermentación y estabilidad aeróbica de yerba guinea ensilada con un aditivo conteniendo inóculo de bacterias y enzimas fibrolíticas. *J. Agric, Univer. P.R.*, 85: 151-164.
- Rook, A.J. 1991. AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Report 8. Voluntary intake of cattle. *Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)*, 61 (11): 815-823.
- Rook, A. J., and M. Gill. 1990. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle linear regression analyses. *Anim. Prod.* 50:425–438.

- Rust, S. R., M.S. Kim, and G. L. Enders. 1989. Effects of a microbial inoculants on fermentation characteristics and nutritive value of corn silage. *J. Prod. Agric.* 2; 235.
- SAS Institute Inc. (2004). SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Institute, Inc Cary, NC.
- Schlegel, H.G. 1987. *General Microbiology*. 6th ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK
- Seale, D.R. 1986. Bacterial inoculants as silage additives. *J. Appl. Bact. Symp. Supp.* 9S.
- Seglar, W.J. 1993. Dairy production management –Silage management. Pionner Hr-Bred Int'l, Inc. 4 state Applied Nutrition Conference, La Crosse WI. June 29-30.
- Spoelstra, S.F., M.G. Courtin, and J.A.C. van Beers. 1988. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. *J. Agr. Sci. Camb.*, 111: 127-132.
- Teller, E., M. Vanbelle, P. Kamatali, G. Collignon, B. Page, and B. Matatu. 1990. Effect of chewing behaviour and ruminal digestion processes on voluntary intake of grass silages by lactating dairy cows. *J. Agr. Sci. Camb.*, 68: 3897-3904.
- Thomas, P.C. 1985. Factors affecting the nutritive value of grass silages. In: W. Haresign and D.J.A.Cole (eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Butterworths London. pp. 223-256.
- Thomas, P.C., N.C. Kelly and M.K. Wait. 1976. The effect of physical form of a silage on its voluntary consumption and digestibility by sheep *J. Br. Grassld Soc.* 31: 19 – 22. (Abstr.)
- Titterton, M., and F. B. Bareeba. 2000. Grass and legume silages in the tropics. In L. t'Mannetje, (ed). *Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Smallholders*. Food Agric. Org. United Nations, Rome, Italy. p. 43
- 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, 3583-3597.
- Van Soest, P.J. 1994. Forage Conservation. In: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd. Edition. Cornell University Press: Ithaca, NY pp. 141-151.
- Vendramini, J. M. B., A.A. Desogan, M.L.A. Silveira, L.E. Sollenberger, O. C.M. Queiroz, and W. F. Anderson, 2010. Nutritive value and fermentation parameters of warm-season grass silage. *The Professional Animal Scientist*, 26(2), 193–200.
- Weinberg, Z. G., G. Ashbell, K. K. Bolsen, G. Pahlow, Y. Hen, and A. Azreili. 1995. The effect of a propionic acid bacterial inoculant applied at ensiling, with or without lactic acid

- bacteria, on the aerobic stability of pearl millet and maize silages. *J. Appl. Bact.* 78(4):430-436.
- Wilkins, R.J., K.J. Hutchinson, R.F. Wilson and C.E. Harris 1971. The voluntary intake of silage by sheep:I. Interrelationships between silage composition and intake. *J. Agric. Sci. Camb.* 77, 531-537.
- Wilkinson, J. M. 1983. Silage made from tropical and temperate crops. I. The ensiling process and its influence on feed value. *World Anim. Rev.* Jan-March.
- Wilkinson, J.M. 1998. Additives for ensiled temperate forage crops. F.S Wechsler (ed). Simposio sobre los aditivos en la producción de rumiantes y no rumiantes. Actas del Simposio. XXXV Reunión SBZ. p.53-72.
- Wilson, J.R. 1997. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. In J.A. Gomide (ed.) Proc. of International Symposium on Grazing in Animal Production. Animal Husbandry Department. Federal University of Vicosa. Brazil. p. 173-208.
- Woolford, M.K. 1984. The Silage Fermentation. [Microbiological Series, No.14] Marcel Dekker. New York, and Basle.
- Woolford, M.K. 1990. The detrimental effect of air on silage. *J. Appl. Bact.* 68:101-116.