



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“Cambios en la composición química del ensilaje de maíz tratado con diferentes tipos de inóculos microbianos.”**

**TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Presenta:**  
**Rodrigo Núñez Piña**

**Dirigido por:**  
**Dra. María Guadalupe Bernal Santos**

**Centro Universitario**  
**Querétaro, Qro.**  
**Mayo 2014.**  
**México**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“Cambios en la composición química del ensilaje de maíz tratado con diferentes tipos de inóculos microbianos.”**

**TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Presenta:  
Rodrigo Núñez Piña**

**Dirigido por:  
Dra. María Guadalupe Bernal Santos**

**Sinodales:**

**Dra. María Guadalupe Bernal Santos** \_\_\_\_\_  
**Presidente** **Firma**

**M. en C. Konigsmar Escobar García** \_\_\_\_\_  
**Secretario** **Firma**

**M. en C. Araceli Aguilera Barreyro** \_\_\_\_\_  
**Vocal** **Firma**

**Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez** \_\_\_\_\_  
**Suplente** **Firma**

**Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Mayo 2014.  
México**

## RESUMEN

Se llevó a cabo el presente estudio para determinar el efecto de la inclusión de distintos tratamientos a base de inóculos microbianos sobre la calidad química del ensilaje de maíz a distintos tiempos de almacenamiento. Se evaluaron 7 tratamientos durante 4 tiempos de almacenaje. Los tratamientos evaluados (dosis con base en gramos de material húmedo) fueron: Tratamiento 1) control, sin inóculo; Tratamiento 2) inóculo de *Lactobacillus brevis* (100,000 UFC/g); Tratamiento 3) inóculo de *L. plantarum* (100,000 UFC/g); Tratamiento 4) combinación de T2+T3; Tratamiento 5) T4 + Enzima microbiana (EM, 1640 Unidades/kg); Tratamiento 6) *L.brevis* + *L. plantarum* (en dosis cada uno de 50,000 UFC/g), y Tratamiento 7) T6+EM (1640 Unidades/kg). Los tiempos de almacenamiento fueron 0, 15, 30 y 90 días. Todos los tratamientos fueron hechos por triplicado y analizados a través de un diseño por bloques al azar con un arreglo factorial 7 x 4 (siete tratamientos por 4 tiempos de almacenaje). Se utilizó maíz forrajero criollo de ciclo intermedio, con una edad de 55 días al momento del corte, el cual fue ensilado en microsilos de PVC hidráulico (10 cm de diámetro x 30 cm de alto) con una capacidad aproximada de 1.5 kg, con tapa de hule provista de una válvula Bunsen. Los inóculos fueron disueltos en agua desionizada y rociados sobre aproximadamente 1.5 kg del forraje; este fue mezclado manualmente, colocado y compactado mecánicamente en los microsilos. Una vez cerrado herméticamente, cada microsilo fue inyectado con CO<sub>2</sub> a través de la válvula Bunsen. Al tiempo de almacenaje correspondiente a cada tratamiento, los microsilos se pesaron, se abrieron, tomándose inmediatamente una muestra para medir el pH. Otra muestra fue molida en un molino Wiley con una criba de 2mm utilizando hielo seco y se guardó a -20°C para determinar materia seca por arrastre con tolueno, para nitrógeno amoniacal y para AGV's. El resto del material ensilado se secó en una estufa a 55°C y se molió utilizando también una criba de 2mm, para posteriormente analizar materia seca por estufa a 100°C, proteína cruda, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido. No se encontró diferencia por efecto del aditivo ( $P > 0.001$ ) para ninguna de las variables analizadas siendo las medias ( $\pm$  error estándar): MS55 ( $40.8 \pm 2.5\%$ ), MSTol ( $40.5 \pm 3.2\%$ ), pH (4.67

$\pm 0.37$ ), N-NH<sub>3</sub> ( $0.0336 \pm 0.004\%$ ), PC ( $7.17 \pm 0.62\%$ ), FDN ( $57.3 \pm 4.7\%$ ) y FDA ( $30.4 \pm 3.2\%$ ). Probablemente la alta concentración de materia seca y la baja concentración de carbohidratos no estructurales en el material original no permitieron observar el efecto conservador de los inóculos microbianos.

Palabras clave: ensilaje de maíz, inóculos microbianos, *Lactobacillus*.

## **DEDICATORIA**

A mi familia por todo su apoyo incondicional y porque a pesar de todo siempre estamos juntos:

- Susana Piña Rico.
- Ma. Guadalupe Núñez Piña.
- Ma. Del Carmen Núñez Piña.
- Rosa Ma. Núñez Piña.
- Guadalupe Jimena Loarca Calderón
- Familia Núñez Perusquía.

Y a los que ya no están con nosotros, pero siguen siendo una parte vital en mi vida:

- Ramón Núñez Piña.
- Teresa Piña Rico.
- Sergio Núñez Olguín.
- David Loarca Piña.
- Salvador Zamorano Acosta.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María Guadalupe Bernal Santos por todo el apoyo incondicional que me ha brindado y por hacer esto posible.

Al Dr. Juan de Dios Garza Flores por su apoyo incondicional durante mi desarrollo académico profesional.

A mi familia y amigos por haber estado siempre apoyándome cuando más los necesité.

A mi Tío José Luis Loarca Piña por su gran apoyo durante todo mi desarrollo profesional.

A mis tíos Lamberto Rico Escobar y Teresita Villa por todo su apoyo a lo largo de estos años.

Al M. en C. Konisgmar Escobar García por sus consejos, apoyo y enseñanza.

A la M. en C. Araceli Aguilera Barreyro por estar incondicionalmente apoyando en hacer esto posible.

A la Dra Andrea Margarita Olvera por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. José Guadalupe Gómez Soto, por sus consejos y apoyo brindado en el trabajo de laboratorio.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, en particular a todos los Profesores de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Naturales, por el apoyo académico brindado para mi desarrollo profesional y por haberme facilitado todas sus instalaciones para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

A la Facultad de Ingeniería, en particular al Dr. Genaro M. Soto Zarazúa por el diseño y la fabricación del equipo de compactación del ensilaje.

A la empresa SAFMEX, S.A. DE C.V., por la confianza otorgada para llevar a cabo la evaluación de sus productos y el apoyo económico para el desarrollo del trabajo de investigación.

# CONTENIDO

	<u>Página</u>
Resumen .....	i
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Contenido .....	v
Índice de cuadros .....	vi
Índice de figuras .....	vii
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	3
Forraje fresco .....	3
Henificación .....	4
Métodos de henificación .....	6
Ensilado .....	7
Tipos de silos .....	10
Reacciones químicas ocurridas durante el proceso de ensilado .....	12
Microorganismos que actúan durante el proceso de ensilaje .....	15
Pérdida de nutrientes durante el ensilado .....	18
Aditivos .....	21
Tipos de forraje que se pueden ensilar .....	26
OBJETIVO .....	30
HIPÓTESIS .....	30
JUSTIFICACIÓN .....	30
METODOLOGÍA .....	31
Tratamientos .....	31
Proceso de ensilado .....	31
Análisis de laboratorio .....	32
Análisis estadístico .....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
CONCLUSIÓN .....	57
LITERATURA CITADA .....	58



## ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página</u>
1.	Pérdida de nutrientes por efecto de pre-marchitamiento	19
2.	Pérdidas de materia seca al ensilar un forraje con 70% de humedad	20
3.	Descripción de los tratamientos experimentales	33
4.	Medias mínimas cuadráticas y error estándar de la media del porcentaje de materia seca y pH de ensilaje de maíz con y sin la inclusión de inóculos microbianos	36
5.	Medias mínimas cuadráticas y error estándar de la media del porcentaje de nitrógeno amoniacal y proteína cruda de ensilaje de maíz con y sin la inclusión de inóculos microbianos	46
6.	Medias mínimas cuadráticas y error estándar de la media del porcentaje de fibra detergente neutro y fibra detergente ácida con y sin la inclusión de inóculos microbianos	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura No.</u>		<u>Página</u>
1.	Inoculación del forraje de maíz	32
2.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca a 55° C de ensilaje de maíz	37
3.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca a 100° C de ensilaje de maíz	38
4.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca por arrastre con tolueno de ensilaje de maíz	39
5.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el pH de ensilaje de maíz	43
6.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el contenido de nitrógeno amoniacal de ensilaje de maíz	47
7.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de proteína cruda de ensilaje de maíz	48
8.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de fibra detergente neutro de ensilaje de maíz	53
9.	Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de fibra detergente ácido de ensilaje de maíz	55

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la alimentación ocupa casi el 80% del gasto total de una unidad productiva, razón por la cual es necesario buscar cada vez nuevas estrategias que ayuden a hacer más eficiente la producción animal. En los últimos años el incremento en el precio de los insumos utilizados para la alimentación del ganado, aunado a la escasez que presentan los insumos en ciertas épocas del año, se ha convertido en una problemática que cada vez más ha venido en aumento, a la cual es necesario hacer frente por parte de las unidades productivas conjuntando esfuerzos de centros de investigación, profesionistas del área, ganaderos y gobiernos.

Recientemente, el precio de los granos ha venido a la alza a nivel mundial, lo cual ha hecho que las unidades productivas comiencen a buscar nuevas alternativas en la nutrición animal, que cumplan los requerimientos del ganado para que este pueda expresar su potencial productivo. En el caso de los rumiantes, es necesario suministrar durante todo el año forraje que cumpla sus requerimientos de fibra para poder tener un correcto funcionamiento del rumen. Sin embargo, debido a la forma de crecimiento de las plantas, resulta casi imposible contar a lo largo del año con forraje de calidad, por lo cual se hace necesario conservarlo, ya sea como ensilaje o henificado. El henificado es una técnica de conservación de forraje seco, a través del cual se reduce el contenido de agua de la planta hasta que contenga alrededor de 15% de humedad. No obstante durante este proceso la planta puede perder nutrimentos o bajar su palatabilidad, además que en ocasiones se hace difícil por las condiciones climáticas donde se produce. En contraparte el ensilaje es una técnica de conservación del forraje basada en una fermentación ácido láctica por parte de bacterias como las de los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, entre otras, el cual presenta excelente proporción de vitaminas, alto contenido de humedad, rico en ácidos orgánicos (AGV's), y tiene buena aceptación por el ganado.

Al igual que el proceso de henificado, el ensilar es una actividad que debe realizarse con mucho cuidado ya que un mal ensilado puede favorecer la proliferación de microorganismos indeseables como hongos y bacterias del tipo

coliformes y *Clostridium*, los cuales en lugar de conservar las propiedades del forraje van a descomponerlo cambiando su olor y sabor, haciendo que el ganado no lo consuma y en caso de ser consumido puede generar graves problemas de salud en los animales. Para evitar este tipo de fermentaciones indeseables en los ensilajes y propiciar una buena conservación de los forrajes se han desarrollado numerosos tipos de aditivos que se adicionan al momento de ensilar y dependiendo de su tipo van a tener numerosos mecanismos de acción. Tal es el caso de los inóculos microbianos que se han desarrollado como conservadores de ensilajes (Van Soest, 1994). Entre estos inóculos se encuentran diferentes especies de la bacteria del género *Lactobacillus*.

Con base en estos antecedentes, se diseñó el presente estudio para evaluar el efecto de la inclusión de dos tipos de inóculos microbianos del género *Lactobacillus* empleados solos y combinados a diferentes concentraciones, así como su combinación con una enzima microbiana, sobre la conservación del ensilaje de maíz a diferentes tiempos de almacenamiento.

## **REVISIÓN DE LA LITERATURA**

Actualmente los sistemas de producción pecuaria deben buscar ser más eficientes y con mejores métodos que les permita la sustentabilidad. Uno de los principales factores que va a afectar la producción animal es la alimentación, ya que esta ocupa el 80% de los costos de producción.

En los últimos años el incremento en los precios de los granos y materias primas utilizados en la alimentación del ganado ha repercutido en un alza de los costos de producción de las unidades productivas.

Las unidades de producción que trabajen con rumiantes (ovinos, caprinos, bovinos, etc.), deben contar con una adecuada proporción de forraje en la dieta. Actualmente, las principales formas de ofrecer el forraje son: Fresco, henificado o ensilado (Llamas, 1986). El forraje utilizado dentro de la engorda en corral es generalmente proporcionado en seco a partir de un heno o esquilmo o como ensilaje siendo el de sorgo y el de maíz los más comunes, sin embargo, el forraje también puede proporcionarse fresco, cosechando los cultivos forrajeros en un estado más succulento (Llamas, 1986).

### **FORRAJE FRESCO.**

Como su nombre lo indica, el forraje fresco se emplea cuando el forraje es cortado en un estado succulento, para lo cual se emplea una picadora y un remolque servidor, tiene la ventaja de utilizarse en ciertas regiones con sistemas de riego que permitan numerosos cortes (alfalfa, ryegrass o sorgo forrajero), además no se presentan las pérdidas características de las otras dos técnicas como serían las pérdidas por fermentación, recolección, putrefacción, secado, lluvia, etc. Asimismo este forraje es más aceptado y tiene buena digestibilidad, rico en carotenos, además se evitan las pérdidas por pisoteo sufridas en el pastoreo; sin embargo, para llevarse a cabo se requiere equipo necesario y su uso se dificulta por el alto porcentaje de humedad, llegando a sobrecargar las mezcladoras, haciendo necesario programar la producción animal con la disponibilidad del forraje. El valor nutritivo del forraje verde varía dependiendo la especie y del estado de madurez, entre otros factores como clima, estación, suelo,

etc. (Llamas, 1986). Los cambios y la variación del porcentaje de forrajes en una ración pueden explicar la variabilidad de la eficiencia productiva debido a que los forrajes de mala calidad presentan tasas de paso más lentas en el rumen (Intervet, 2006).

Muchos cultivos presentan una estacionalidad, siendo abundantes en las lluvias y escasos en las secas (Shimada, 1986; Cárdenas *et al.*, 2003). Las propias características de los forrajes hacen que estos no tengan la misma calidad a lo largo del año, ya que en ciertas épocas llegan a presentar bajos niveles de nitrógeno con un alto porcentaje de lignificación afectando directamente su digestibilidad y aprovechamiento. En el caso del trópico, las gramíneas tropicales, presentan un mayor valor nutritivo en épocas lluviosas (Cárdenas *et al.*, 2003). Todo lo anterior resulta en la necesidad de buscar formas de conservar el forraje por largos periodos, de forma tal que no se afecten sus características químicas ni sus propiedades nutricionales, haciéndose una necesidad diaria buscar y mejorar técnicas para conservar el forraje. Actualmente se utilizan principalmente en las unidades productivas dos métodos de conservación del forraje, los cuales son la Henificación y el Ensilaje (Shimada, 1986; Cárdenas *et al.*, 2003).

## **HENIFICACIÓN.**

Método de conservación de forrajes, basado en la disminución del contenido de agua hasta un nivel en que se impidan las reacciones bioquímicas asociadas a la descomposición (25% de humedad o menos) (Shimada, 1986) aunque también se ha mencionado un rango de humedad del 18 al 22% (Cullison, 1983) dependiendo de diversos factores como el grado de fineza del heno, lo compactado de la paca, la humedad del medio ambiente y la velocidad del viento. La humedad puede disminuirse por métodos naturales (radiación solar y viento) o artificial (túneles de desecación) (Shimada, 1986), esta disminución en la humedad además de garantizar que se pueda almacenar sin que se descomponga, también evita que haya pérdidas de nutrientes (Cullison, 1983); sin embargo de acuerdo a Shimada (1986) el valor nutritivo del forraje se reduce al

emplear este método. Por lo general puede utilizarse para henificar materiales de segundo o tercer corte (Moore, 1985).

A través del proceso de henificación se obtiene un forraje fresco, utilizado principalmente como fuente de relleno para la ración, así como una fuente de nutrientes al poseer un aproximado de 25-32% de fibra cruda y un 45-55% de total de nutrientes digestibles (TND) (Cullison, 1983).

Al realizar la henificación bajo condiciones climatológicas desfavorables, se pueden llegar a perder energía, vitaminas y minerales importantes para la alimentación animal (Moore, 1985). No obstante, el principal riesgo que sufre esta técnica se presenta al momento de la cosecha, momento en el cual puede sufrir pérdidas, entre las cuales se encuentran:

- Deshoje: Debido a la pérdida de hojas, el principal impacto que presentan estas pérdidas es debido a que en las hojas se encuentra la parte más nutritiva de la planta.
- Deslave: Se presenta por efecto de la lluvia sobre el material henificado, perdiéndose los nutrientes más solubles de la planta.
- Achicalado: Se debe a una excesiva exposición del producto a los rayos solares, presentándose la pérdida principalmente de carotenos (Cullison, 1983).

Pueden henificarse tanto leguminosas como gramíneas o mixtos, siendo la alfalfa uno de los más utilizados. Sin embargo, esta última llega a presentar grandes pérdidas de nutrientes en forma de hojas. Otros materiales utilizados son los zacates; sin embargo tienen menor palatabilidad y bajos contenidos de proteína, fósforo y caroteno.

La calidad del henificado está dado por factores como el estado fenológico de la planta, el clima, contenido foliar, acción de enzimas vegetales, oxidación por exposición a luz solar y contaminación microbiana (Shimada, 1986). Siendo en un estado de madurez cercano a la temprana floración el estado ideal para la henificación (Cullison, 1983).

## **MÉTODOS DE HENIFICACIÓN.**

En primer lugar, es necesario que el material forrajero que va a ser henificado se rastrille antes de estar completamente seco de para evitar que se deshoje y tenga una excesiva exposición al sol (Cullison, 1983).

Existen numerosos métodos para henificar, entre los cuales se encuentra el secado al sol, el secado bajo techo y secado artificial.

### ***Secado al sol.***

Para este método existen numerosas técnicas para hacer un secado más uniforme como lo sería el volteado, el esparcido y el desgarrar. Por su parte el volteado es un método simple, y se basa en invertir los montones de forraje, transfiriéndolos a una superficie más seca, aumentando la desecación por aireación. El esparcido como su nombre lo indica consiste en esparcir el forraje de forma tal que se garantice la aireación. El desgarrar está relacionado con métodos de corte de forraje que implican desgarrar o laceración de las plantas incrementando la velocidad de la henificación (Shimada, 1986).

### ***Secado bajo techo.***

El forraje es inicialmente secado al sol hasta alcanzar 35% de humedad y posteriormente es almacenado y se termina de henificar bajo techo, utilizando ventilación artificial y/o una fuente de calor. Tiene la ventaja de perder menos materia seca, con mayor contenido de nutrientes que el material secado al sol; sin embargo requiere un costo de material y equipos mayor y requiere mayor espacio de almacén (Shimada, 1986).

### ***Secado artificial.***

Se utiliza una secadora especial, teniendo la ventaja de que no se depende de las condiciones climatológicas, se minimizan las pérdidas tanto de materia seca como de nutrientes y disminuye la posibilidad de crecimiento microbiano; sin embargo se enfrenta a los costos de la maquinaria y del combustible (Shimada, 1986).



Una vez secado el forraje es necesario que este se empaque lo más pronto posible, en el caso de las pacas cuadradas es necesario que estas sean almacenadas lo más pronto posible para evitar que se mojen con la lluvia, en el caso de pacas redondas estas pueden ser dejadas en el campo más tiempo debido a que estas tienden a escurrir la lluvia (Cullison, 1983).

## **ENSILADO.**

El ensilaje es un método de conservación de forrajes húmedos, basado en una fermentación natural bajo condiciones de anaerobiosis, donde las bacterias ácido lácticas convierten los carbohidratos solubles en ácidos orgánicos, resultando en la disminución del pH y en la preservación del forraje (Koc *et al.*, 2008). Se entiende por ensilado al producto obtenido de la fermentación controlada de los cultivos de alto contenido de humedad (McDonald *et al.*, 1995). La finalidad del ensilaje es preservar el forraje con la mínima pérdida de nutrimentos (Shimada, 1986; Jalč *et al.*, 2009). El ensilaje es el método de conservación de los cultivos preferidos, manteniendo los nutrientes del forraje, asegurando un adecuado nivel nutricional al momento de ofrecerlo en la ración (Nkosi *et al.*, 2011). Cuando los forrajes son conservados en ensilajes, estos mantienen la misma concentración de ácidos grasos de cadena larga de cuando fueron cosechados (Jalč *et al.*, 2009). Los productos de la fermentación son ácidos orgánicos (láctico, acético y butírico), etanol, gases de la fermentación (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO, NO y NO<sub>2</sub>), agua y calor (Cullison, 1983).

En comparación con el proceso de henificado, el ensilaje permite conservar mayor cantidad de nutrientes, reduce la utilización de otros productos complementarios para la alimentación, las plantas pueden cosecharse más pronto, mayor vida de almacenamiento, tanto la recolección como el suministro a los animales se puede mecanizar, elimina el riesgo de incendios por ignición espontánea presentado en el caso de henificados mal elaborados (Moore, 1985). Factores como la alta precisión y capacidad de las cosechadoras, la mejora de los silos, láminas de polietileno y máquinas de corte desgarradoras del forraje convirtieron el ensilaje en el principal método de conservación del forraje para

productores de ganado tanto de carne como de leche en Norte América en la década de 1990 (Bolsen *et al.*, 1995).

La calidad y el valor nutricional del ensilaje son influenciados por numerosos factores tanto biológicos como tecnológicos (Bolsen *et al.*, 1995), como la materia seca (Bolsen *et al.*, 1995; Kung, 2010), el cultivo, el estado de madurez, que el forraje haya sido cortado adecuadamente, tipo de silo, velocidad de llenado, la densidad del forraje después de haberse empacado, técnica de sellado, condiciones climatológicas durante la cosecha, uso de aditivos efectivos, entrenamiento del personal (Bolsen *et al.*, 1995), así como la capacidad buffer del forraje, la concentración de carbohidratos solubles y el tipo y número de microorganismos dominantes durante el proceso de fermentación (Kung, 2010).

Para lograr un buen ensilado, el principal objetivo es lograr condiciones ácidas y de anaerobiosis (McDonald *et al.*, 1995; Shimada, 1986; Cullison, 2003) y frenar la proteólisis anaeróbica de origen clostridiano (Shimada, 1986), para lo cual resultan esenciales los silos impermeables al aire, cubiertas de plástico, buena compactación y picado de forraje en pedazos pequeños (Moore, 1985). Es necesario que al momento de ensilar, el forraje tenga un porcentaje de humedad del 66-72%, un contenido de glúcidos solubles de entre el 6 y el 8% en relación a la materia seca, así como una mínima capacidad amortiguadora, una población elevada de lactobacilos y una compactación y temperatura ideal que permita una rápida reproducción microbiana (Shimada, 1990). La concentración de materia seca en el forraje tiene un efecto sustancial sobre la fermentación, consumo de alimento y desempeño productivo del ganado (Guo *et al.*, 2013). El agua actúa como sustrato para las bacterias y contribuye, por su peso a una buena compresión para la exclusión del aire de la masa de ensilaje (Moore, 1985). El agua es el medio donde se desarrollan los procesos de fermentación, asimismo, el forraje con mucha agua tendrá mayores pérdidas por escurrimiento arrastrando nutrimentos solubles (azúcares, proteínas, vitaminas, minerales, etc.). Sin embargo, el forraje con altos niveles de agua puede promover el crecimiento de microorganismos nocivos para el proceso de fermentación, por otra parte, si el forraje contiene muy poca humedad, tiende a aumentar su densidad, dificultando

su compactación, aumentando el desperdicio por contaminación (Shimada, 1990). La concentración de agua en el forraje para ensilar, también determina la proporción entre materia seca y materia húmeda, lo cual está relacionado directamente con la proporción de paredes celulares del forraje, pudiéndose incrementar la concentración de lignina con respecto a celulosa y hemicelulosa (Van Soest, 1994). Para lograr la anaerobiosis es necesario picar el cultivo, llenando rápidamente el silo y efectuando una adecuada compactación y cierre para evitar la reentrada y circulación de aire durante el proceso de conservación, ya que si el oxígeno entra en contacto con el producto durante el proceso, esto generará la proliferación de microorganismos aerobios pudriendo el material almacenado, haciéndolo en muchos casos tóxico. Asimismo es necesario evitar la entrada de microorganismos indeseables como lo es el caso de clostridios y enterobacterias, dichos microorganismos pueden inhibirse estimulando el crecimiento de bacterias ácido lácticas o empleando aditivos químicos (McDonald *et al.*, 1995). La dirección del proceso de la fermentación del ensilaje puede quedar determinada en las primeras 24-48 horas, por el grado de exclusión de aire (Moore, 1985).

Las bacterias ácido lácticas actúan fermentando los azúcares presentes en los cultivos (principalmente glucosa y fructosa) generando la formación de ácidos orgánicos, principalmente el láctico (McDonald *et al.*, 1995) a través de dos principales rutas metabólicas:

- Fermentación homoláctica: Actúa sobre los carbohidratos solubles presentes en el forraje convirtiendo las hexosas (glucosa, fructosa, manosa, entre otros) en 2 moléculas de ácido láctico.
- Fermentación heteroláctica: Convierte las hexosas en ácido láctico, etanol y bióxido de carbono.

De estos dos tipos de fermentaciones, la fermentación heteroláctica se considera por lo general como indeseable comparada con la fermentación homoláctica (Kung & Ranjit, 2001).

El ácido láctico producido durante la fermentación anaeróbica del ensilaje incrementa la concentración de hidrogeniones hasta alcanzar niveles en los cuales

las bacterias indeseables no pueden sobrevivir (McDonald *et al.*, 1995). En el caso de forrajes con demasiados azúcares (caña de azúcar), la fermentación puede dominarse por la presencia de levaduras (Shimada, 1986; Kung, 2010) del género *Saccharomyces*, que convierten la hexosa en alcohol (2 etanol) y CO<sub>2</sub> (Shimada, 1986).

La clave para tener un buen ensilado es la rápida exclusión de aire de la masa de forraje, lo cual va a resultar en una rápida producción de ácido láctico y la disminución del pH del silo, y prevenir la penetración de aire al interior de la masa de ensilaje durante el almacenamiento (Kung, 2010).

### **TIPOS DE SILOS.**

Existen numerosos tipos de silos, pueden ir desde los pequeños sacos de plástico hasta grandes torres cilíndricas de acero, cemento o madera, siendo el silo de trinchera el más empleado (McDonald *et al.*, 1995). En general se dividen en dos grupos que son horizontales y verticales dependiendo de la orientación que presenten, siendo los silos horizontales los que requieren mayores cuidados para su preparación que los verticales, ya que en este silo, no se puede ejercer un efecto de compactación por efecto del mismo peso del forraje, resultando necesario utilizar un tractor para compactar conforme se va llenando el forraje (Moore, 1985). Dependiendo del tipo de silo que se trate, los autores manejan diferentes rangos de materia seca del forraje a ensilar. Entre los principales tipos de silos son:

- Horizontales.
  - Trinchera.
  - Bunker.
  - Bolsa
- Verticales.
  - Verticales convencionales.
  - Herméticos o sellados.

### ***Silos Horizontales.***

#### Silos Trinchera.

Estos silos se fabrican de tierra o concreto, siendo este último el más utilizado principalmente para el fondo, para evitar lodazales. Este tipo de silos tienden a llenarse de la parte superior a la inferior utilizando vagones de volteo o camiones, ayudándose para el apisonamiento con un tractor a medida que el silo se va llenando, posteriormente se coloca una cobertura de polietileno grueso encima, manteniéndose en su lugar por medio de piedras, tierra, tablas, llantas, etcétera. Para vaciarse, es necesario hacerlo del extremo inferior hacia el superior (Cullison, 1983).

#### Silos Bunker.

Se utiliza por lo general en suelos permeables que no permiten hacer un silo trinchera. Las paredes laterales son hechas con postes o tablones los cuales se recubren con papel para construcción o tela de plástico, el piso normalmente es de concreto y se dejan los extremos libres (Cullison, 1983).

#### Silos de Bolsa.

Se utilizan bolsas fabricadas con polietileno de baja densidad (250 micrones de espesor), las cuales se fabrican por el método de extrusado. Estas bolsas están constituidas por tres capas:

- Exterior: Es de color blanca y esta adicionada de dióxido de titanio, que le permite reflejar los rayos solares principalmente rayos ultravioleta.
- Intermedia: No tiene características especiales.
- Interior: Adicionada de carbón que reduce la penetración de la radiación solar.

El silo de bolsa promedio llega a almacenar 200 toneladas y consiste en un cilindro de 75 metros de largo y 2.70 metros de diámetro, sin embargo en el mercado se llegan a encontrar silos de bolsa con capacidad de hasta 400

toneladas. Estas bolsas además de capacidad permeable, sirven de barrera física para la entrada de plagas (Bossio, 2013)

### ***Silos Verticales.***

Silos Verticales convencionales.

Construidos a base de concreto reforzado o con estacas de concreto, son de forma circular, por lo general poseen un techo. Provisos de una serie de puertas cuadradas cada 1.83 metros, las cuales miden 0.61 metros, estas puertas se van cerrando a medida que se va llenando el silo y se van abriendo conforme se va vaciando por lo general miden de 3.66 a 5.49 metros de diámetro y de 12.19 a 24.34 metros de alto, estos silos se descargan por la parte superior por medio de un descargador mecánico (Cullison, 1983).

Silos Herméticos.

Construidos con metal protegido por un cemento mucoso que cubre las uniones, tienen un tamaño de más o menos 3.658 a 7.315 metros de diámetro y de 12.192 a 30.48 metros de altura (Cullison, 1983).

### **REACCIONES QUÍMICAS OCURRIDAS DURANTE EL PROCESO DE ENSILADO.**

Inmediatamente después del corte y durante las primeras fases del ensilado, se llevan a cabo cambios químicos debido a la actividad enzimática presente en las plantas, llevándose a cabo reacciones de respiración y proteólisis (McDonald *et al.*, 1995). Al momento de la recolección, la mayor cantidad de bacterias presentes en el forraje son aerobias, las cuales en la primer fase van a crecer junto con bacterias facultativas, lo cual, junto con la respiración propia de la planta va a agotar el oxígeno de la masa de ensilaje (Moore, 1985). Debido a los diversos procesos bioquímicos que se desarrollan al momento del ensilaje, el forraje puede fermentar a la producción de numerosos productos químicos, como lo sería el ácido láctico, ácido butírico, ácido acético, alcohol; denominándose al ensilaje dependiendo del metabolito resultante de la fermentación (Shimada, 1990), siendo la fermentación acética la que se produce en las primeras horas del

ensilado (De la rosa, 2005), siendo el ácido acético un buen agente antimicrobiano (Kung, 2010).

La respiración se define como la degradación oxidativa de compuestos orgánicos para obtener energía. La principal fuente respiratoria la constituyen los carbohidratos, siendo primero la oxidación de la glucosa durante la glicólisis y posteriormente su oxidación por la vía del ciclo de Krebs (McDonald *et al.*, 1995), con formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (McDonald *et al.*, 1995; Moore, 1985); en el caso de las plantas recién cortadas casi toda la energía de la glucosa es convertida en calor (McDonald *et al.*, 1995). El calor que producen las células del material forrajero tiende a producir un ambiente favorable para las bacterias anaeróbicas (Cullison, 1983), sin embargo, esto sucedería en caso de un silo en el cual hay presencia de oxígeno y por lo tanto en el silo estarían predominando las bacterias aeróbicas que tienen un efecto nocivo para el silo. Cuando los silos no han sido compactados adecuadamente los carbohidratos pueden ser el sustrato en el proceso de oxidación, formando dióxido de carbono y agua, con lo cual disminuye la cantidad de carbohidratos solubles disponibles para la siguiente fase de la fermentación a cargo de las bacterias ácido lácticas (McDonald *et al.*, 1995), la respiración incrementa la temperatura del silo (McDonald *et al.*, 1995; Shimada, 1990). Durante las fases iniciales de ensilaje, se presenta una fermentación acética debido a la presencia de enterobacterias, las cuales requieren una temperatura óptima de 18-25°C, dichas bacterias van siendo reemplazadas por las bacterias lácticas conforme se van alcanzando condiciones de anaerobiosis y de acidez (De la Roza, 2005), asimismo, dicho proceso tiene un efecto directo disminuyendo la cantidad de materia seca y compuestos del ensilaje (McDonald *et al.*, 1995; Shimada, 1986), asimismo disminuye la concentración de carbohidratos solubles utilizados para el proceso fermentativo (Moore, 1985; Shimada, 1990). Durante este proceso, las bacterias ácido lácticas pueden ser utilizadas como sustrato para crecimiento por parte de las levaduras (Kung & Ranjit, 2001). El proceso de respiración va a terminar en el momento en que se alcanzan condiciones de anaerobiosis, para lo cual hay que tener un silo bien compactado

(McDonald *et al.*, 1995), ya que en ausencia de aire los microorganismos benéficos convierten los azúcares en ácido láctico (Shimada, 1986).

Por su parte la proteólisis, se define como una hidrólisis de los enlaces peptídicos. Debido a que en las plantas 75-90% del nitrógeno total se encuentra en forma de proteína, una vez que son cortadas se produce el proceso de proteólisis, el cual puede reducir el contenido proteico hasta en un 50% tras unos días en el campo, una vez ensilado el material, la proteólisis continúa aunque dicha actividad se reduce conforme desciende el pH (McDonald *et al.*, 1995), debido a la alta especificidad que tienen las enzimas a actuar en pH neutros, asimismo los microorganismos que generan la proteólisis son microorganismos sensibles al pH ácido. La proteólisis se debe principalmente a la actividad microbiana y en menor medida a la actividad enzimática (McDonald *et al.*, 1995).

Después del periodo de adaptación, se presentan las condiciones de anaerobiosis, lo cual oscila de 4 a 5 horas (Moore, 1985). La fermentación es el proceso mediante el cual, ciertos microorganismos van a convertir los carbohidratos solubles en ácido láctico, con lo cual se va a garantizar la conservación del alimento por tiempo indefinido (Shimada, 1990). El proceso de fermentación se da por terminado con la acumulación de ciertos productos del metabolismo bacteriano (ácidos orgánicos principalmente láctico, acético y butírico, gases de la fermentación como CO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, así como etanol en cantidades variables, agua y calor) los cuales tienden a preservar el material forrajero de forma indefinida (Cullison, 1983).

Cuando los forrajes han sido fertilizados utilizando productos ricos en nitrógeno, dichos compuestos fertilizantes pueden almacenarse en los tejidos de ciertas plantas en forma nítrica. Posteriormente las enzimas de las plantas y de las bacterias transforman los nitratos en nitritos y posteriormente en óxido de nitrógeno, el cual se va a desprender de la masa del ensilaje en forma de óxido de nitrógeno, el cual al entrar en contacto con el aire va a formar bióxido de nitrógeno, dicho gas es un gas rojizo altamente tóxico (Moore, 1985).

En caso que se haya contaminado el silo con aire o agua, esto puede ser perjudicial para el ensilaje (Moore, 1985; Shimada, 1990; Koc *et al.*, 2008; Kung,



2010) ya que se llega a promover el desarrollo de ciertos microorganismos que convertirán el ácido láctico y azúcares en ácido butírico, las proteínas en amoníaco, calentando el material (Moore, 1985; Shimada, 1990), incremento del pH debido a la degradación del ácido láctico (Kung, 2010), y facilitando la proliferación de hongos (Shimada, 1986; Shimada, 1990; Cullison, 1983) y bacterias oportunistas. Específicamente, las levaduras son los principales microorganismos que causan deterioro de los silos, ya que degradan el ácido láctico en presencia de aire, las especies de levaduras más comunes son *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Issatchenkia* y *Saccharomyces* (Kung, 2010). Algunos estudios reportan que el adicionar bacterias ácido lácticas homofermentativas, afectaban la estabilidad aeróbica del ensilaje de cultivos de cereales maduros, esto fue sugerido por el aumento en el pH, crecimiento visible de mohos y una intensa producción de CO<sub>2</sub> durante la exposición aeróbica, esto posiblemente debido a que las bacterias ácido lácticas producen principalmente ácido láctico, sin embargo, bajo condiciones aerobias, este ácido láctico puede servir de sustrato para ciertas levaduras (Koc *et al.*, 2008)

## **MICROORGANISMOS QUE ACTÚAN DURANTE EL PROCESO DE ENSILAJE**

En las plantas, los microorganismos más abundantes son tanto hongos como bacterias de tipo aerobias, sin embargo a medida que se van desarrollando condiciones de anaerobiosis en el silo, la población bacteriana comienza a ser reemplazada por bacterias anaerobias como las bacterias ácido lácticas, clostridios y enterobacterias (McDonald *et al.*, 1995).

### ***Bacterias ácido lácticas.***

Son bacterias anaerobias facultativas, por lo general se encuentran en pequeñas cantidades en los cultivos en crecimiento, sin embargo, al momento de la recolección éstas se multiplican sobre todo si el forraje se pica o desgarras. Se clasifican en dos grupos dependiendo del resultado de su fermentación:

- Bacterias Homofermentativas: Como producto de la fermentación producen únicamente ácido láctico. En este grupo se encuentran bacterias como *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecalis*.
- Bacterias Heterofermentativas: Bacterias cuyo producto de la fermentación es el ácido láctico y otros productos como el etanol y el CO<sub>2</sub>. Ejemplos de este grupo son *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc mesenteroides* (McDonald *et al.*, 1995).

Las bacterias ácido lácticas actúan sobre los carbohidratos (Moore, 1985; Nkosi *et al.*, 2011). Estas bacterias una vez ensilado el forraje, se multiplican, fermentando los carbohidratos hidrosolubles (carbohidratos de bajo peso molecular como la glucosa, fructosa, galactosa, manosa y almidón) produciendo ácidos orgánicos, principalmente el láctico con lo cual disminuye el pH (McDonald *et al.*, 1995), esta disminución del pH inhibe futuras degradaciones por otro tipo de bacterias (Nkosi *et al.*, 2011). Durante el ensilado, se presenta además una hidrólisis de hemicelulosas, liberándose pentosas, las cuales fermentan hasta ácido láctico y acético por la mayoría de bacterias ácido lácticas (McDonald *et al.*, 1995).

### ***Clostridios.***

Grupo de bacterias aerobias estrictas, se les puede encontrar en forma de esporas en los forrajes, se dividen en dos grupos:

- Sacarolíticos: Por ejemplo *Clostridium butyricum* y *C. tyrobutyricum*. Estas bacterias fermentan el ácido láctico y los carbohidratos hidrosolubles residuales, teniendo como producto de su fermentación el ácido butírico, dando lugar a un incremento del pH debido a su acción sobre el ácido láctico.
- Proteolíticos: Por ejemplo *C. bifermentans* y *C. sporogenes*. Los cuales fermentan aminoácidos, teniendo como producto de su fermentación los ácidos acético y butírico, así como aminas y amoníaco.

Los clostridios requieren condiciones de alta humedad para su multiplicación, en el caso de cultivos muy húmedos (MS 150g/kg), pueden continuar su actividad a pesar de tener un pH de 4 (McDonald *et al.*, 1995).

### ***Enterobacterias.***

También llamadas ácido acéticas o coliformes, son bacterias anaerobias facultativas, entre las cuales se encuentra *Escherichia coli* y *Erwinia herbicola*, éstas bacterias tienden a competir con las bacterias ácido lácticas por los carbohidratos hidrosolubles, los cuales fermentan hasta generar ácido acético, etanol e hidrógeno, asimismo puede descarboxilar y desaminar aminoácidos, produciendo grandes cantidades de amoníaco (McDonald *et al.*, 1995). Las bacterias acéticas crecen a un pH de 7, razón por la cual solo se encuentran en las fases iniciales de la fermentación donde se obtiene un pH favorable (McDonald *et al.*, 1995).

Recientemente se ha sugerido que el ácido acético bacteriano puede ser usado para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje, después de descubrir altas concentraciones de ácido acético en ensilajes de maíz expuesto al aire, contaminado con altas poblaciones de *Acetobacter pasteurianus*, lo cual contradice la idea de que el ácido acético bacteriano puede iniciar el deterioro aeróbico. Bacterias ácido acéticas del género *Gluconobacter*, pueden convertir el etanol a ácido acético mediante el uso de alcohol y de la deshidrogenasa acetaldehído; sin embargo estas no pueden oxidar completamente el ácido acético al láctico, ya que carecen de las enzimas necesarias (Queiroz *et al.*, 2013).

### ***Hongos.***

Se encuentran en el suelo y vegetación, pueden clasificarse como mohos o levaduras dependiendo como se multipliquen.

Entre el grupo de levaduras presentes en los ensilados está *Candida*, *Saccharomyces* y *Torulopsis*. Estas tienen efectos nocivos para el ensilaje, deteriorándolos al quedar expuestos al aire (McDonald *et al.*, 1995). Las levaduras, pueden utilizar el almidón como fuente de energía, bajo condiciones

anaeróbicas, las levaduras pueden fermentar el almidón en etanol, pero cuando el aire está presente, algunas levaduras son capaces de asimilar el ácido láctico, lo cual deteriora el ensilaje (Kung *et al.*, 2007).

En el caso de los mohos, estos por lo general son aerobios estrictos y pueden producir micotoxinas. Entre los principales mohos en el ensilaje se encuentran *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (McDonald *et al.*, 1995).

Tanto los mohos como las levaduras pueden inhibirse en presencia de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) (Koc *et al.*, 2008).

### **PÉRDIDA DE NUTRIENTES DURANTE EL ENSILADO.**

Existen diferentes causas de pérdidas de nutrientes desde la cosecha hasta la obtención del producto final del ensilado, entre las causas principales de pérdidas de nutrientes durante el ensilado tenemos:

1. Pérdidas en el campo.
2. Pérdida por oxidación.
3. Pérdidas por fermentación.
4. Pérdidas de líquidos.

#### ***Pérdidas en el campo.***

Pérdidas en el campo, las cuales dependen de las condiciones climáticas, afectándose principalmente los carbohidratos solubles, así como las proteínas que se hidrolizan con formación de aminoácidos (McDonald *et al.*, 1995). En condiciones normales estas pérdidas representan aproximadamente el 5% por efecto de la cosecha (Shimada, 1986). En el Cuadro 1 se puede observar el porcentaje de pérdidas debido al periodo de pre-marchitamiento a partir del periodo de sega.

**Cuadro 1. Pérdida de nutrientes por efecto de pre-marchitamiento**

<b>Periodo de pre-marchitamiento</b>	<b>Pérdida de nutrientes</b>
24 horas	1-2 %
5 días	6%
8 días	10%

(McDonald *et al.*, 1995).

***Pérdidas por oxidación.***

Otro tipo de pérdidas es la llamada pérdida por oxidación, la cual es debida a la acción de enzimas de las plantas y microorganismos sobre azúcares, principalmente en presencia de oxígeno, esta acción enzimática da como resultado CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En el caso de silos que son llenados rápidamente y cerrados, el oxígeno contenido entre los tejidos vegetales tiene poca importancia y representa pérdidas únicamente del 1% de la MS, sin embargo, la exposición constante de los forrajes al oxígeno produce la formación de un producto fermentado no comestible pudiendo alcanzarse pérdidas de hasta el 75% por esta causa (McDonald *et al.*, 1995). Esta se disminuye en caso que el silo esté cubierto (4.0% vs. 12.5%) (Shimada, 1986).

***Pérdidas por fermentación.***

Las pérdidas por fermentación como su nombre lo indica son efecto del proceso de fermentación de los nutrientes (McDonald *et al.*, 1995). Acompañada de las pérdidas por contaminación, representa las principales causas de pérdidas (en forma de gases) (Shimada, 1990). Por efecto de bacterias ácido lácticas, las pérdidas de materia seca son mínimas (inferiores al 5%), y las pérdidas de energía bruta debido a la formación de etanol son inclusive menores, sin embargo, en las fermentaciones de clostridios y enterobacterias, como consecuencia de la formación de gases como CO<sub>2</sub>, hidrógeno y amoníaco, las pérdidas de nutrientes pueden ser mayores que en el caso de las fermentaciones de bacterias ácido lácticas (McDonald *et al.*, 1995). Esta pérdida suele ser menor si el silo está cubierto (6.2% vs. 8.5%) (Shimada, 1986; Shimada, 1990). En ciertos casos,

cuando se han utilizado inóculos microbianos a base de *Lactobacillus buchneri*, pueden presentarse mayores pérdidas de materia seca al ensilar maíz (en promedio 1% de materia seca) comparado con silos que no han sido inoculados; mientras que al ensilar pastos y granos pequeños, estos presentan una pérdida de materia seca moderada por efecto de inocular *Lactobacillus plantarum*, respecto a silos no inoculados llegando a tener pérdidas a lo mucho del 18% de materia seca (Reich & Kung, 2010).

### ***Pérdidas de líquidos.***

Debido a que la mayoría de los silos permiten la salida de líquidos, se presenta un tipo de pérdidas llamada pérdidas de líquidos, debido a que en muchos casos estos líquidos arrastran consigo una alta cantidad de nutrientes presentes en el ensilaje. En el caso de forrajes ensilados con niveles de materia seca de 150g/kg, pueden experimentar pérdidas de hasta el 10%, asimismo forrajes pre-marchitos con contenidos de hasta 300g/kg de MS producen poca cantidad de líquidos (en algunos casos no llegan a presentar nada de líquidos) (McDonald *et al.*, 1995).

Estas pérdidas pueden estar relacionadas directamente con el tipo de silo que se emplea. En el Cuadro 2 se presenta el porcentaje de pérdidas respecto al tipo de silo empleado:

Cuadro 2. Pérdidas de materia seca al ensilar un forraje con 70% de humedad.

Tipo de Silo	Pérdidas (%)					
	En el campo	Líquidos	Fermentación	Contaminación	Durante secado	Total
Torre convencional	5.0	1.0	7.0	5.0	5.0	23.0
Torre hermético	5.0	1.0	6.5	-.-	5.0	17.5
Trinchera descubierto	5.0	1.0	8.5	12.0	5.0	31.5
Trinchera cubierto	5.0	-.-	6.0	4.0	5.0	20.0
Pastel descubierto	5.0	2.0	10.0	20.5	5.0	42.5
Pastel cubierto	5.0	-.-	-.-	4.0	5.0	20.0

(Shimada, 1990).

## **ADITIVOS**

En ciertas ocasiones, el material a ensilar no cuenta con los requisitos mencionados para poderse ensilar adecuadamente, es posible manipular la fermentación a través de numerosas técnicas como lo es el control de la humedad, la adición de ácidos, el uso de antibióticos, o bacteriostáticos, microorganismos, ingredientes como melazas que aumentan las concentraciones de carbohidratos solubles, etc. (Shimada, 1990). Los aditivos son agregados a los forrajes ensilados, para prevenir o reducir el crecimiento de microorganismos indeseables además de mejorar la fermentación y la estabilidad aeróbica (Queiroz *et al.*, 2013) mejorando la calidad del ensilaje (Ozduven *et al.*, 2010). En el caso del sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), éste es rico en fibra, lo que puede afectar negativamente la digestibilidad de los nutrientes. Consecuentemente los aditivos para ensilaje han llegado a usarse para mejorar el proceso de ensilaje y la utilización de nutrientes por parte de los rumiantes (Nkosi *et al.*, 2012). Los aditivos pueden dividirse en tres categorías: 1) estimulantes de la fermentación como los inóculos bacterianos y enzimas; 2) inhibidores de la fermentación como los ácidos propiónico, fórmico y sulfúrico; y 3) sustrato o fuentes de nutrientes como las melazas, urea y amoníaco anhidro (Bolsen *et al.*, 1995), siendo los inóculos microbianos y las enzimas los más populares (Ozduven *et al.*, 2010).

### ***Control de humedad.***

Forraje muy húmedo al momento de ensilar presenta mayores pérdidas debido al escurrimiento, puede favorecer el crecimiento de microorganismos, para lo cual se puede dejar tendido el forraje en el sol durante varias horas después del corte dependiendo la región, época del año, intensidad solar, etc. (McDonald *et al.*, 1995; Shimada, 1990). También se puede al momento de ensilar agregar algún material seco (pajas, rastrojos, etc.), esta última técnica tiene la desventaja de que el material seco al tener un valor nutritivo inferior al forraje, tiende a reducir la calidad del producto final (Shimada, 1990).

En caso que el forraje esté más seco de lo normal, se va a dificultar su compactación debido a que va a aumentar su densidad, lo cual va a repercutir en

mayores pérdidas por contaminación, lo cual puede revertirse adicionando ya sea agua directamente o materiales con elevada humedad, pudiendo incrementar la palatabilidad del silo (Shimada, 1990).

### ***Ácidos minerales y orgánicos.***

Se trata principalmente de numerosos compuestos químicos, aunque estos han tenido poca aceptación a nivel comercial, entre estos se encuentra una mezcla de ácidos minerales propuesta por A.I. Virtanen (citado McDonald *et al.*, 1995, y Moore, 1985) donde ácidos como el sulfúrico y clorhídrico se añaden al forraje al momento de ensilar, con el objetivo de bajar el pH a menos de 4. Entre los ácidos más utilizados están el sulfúrico y clorhídrico; sin embargo, estos presentan elevados costos (Shimada, 1986), por lo que actualmente se ha llegado a utilizar el ácido propiónico y el ácido fórmico (McDonald *et al.*, 1995; Shimada, 1990). Con esta técnica no se produce la inhibición total del crecimiento microbiano y tiene lugar cierta fermentación ácido láctica, este ácido fórmico se utiliza principalmente en forrajes difíciles, de bajo contenido en carbohidratos como leguminosas y gramíneas, se han obtenido mejoras en los rendimientos de los animales y la ingestión de materia seca (McDonald *et al.*, 1995). Metabisulfito de sodio en polvo, se aplica de 3.5 a 4.5 kg por tonelada de forraje verde, dosis mayores bajan la palatabilidad del ensilaje. Al entrar en contacto con el agua, del ensilaje, se forma bióxido de azufre, el cual se transforma en ácido sulfuroso, reduciendo la respiración de las plantas y una fermentación excesiva (Moore, 1985). Mientras los ácidos orgánicos como el propiónico, benzoico y sórbico tienen una fuerte actividad antimicrobiana, pueden ser usados para incrementar la estabilidad aeróbica del ensilado la actividad antimicrobiana de dichos ácidos se debe a su habilidad de pasar la membrana celular en forma no disociada y liberar hidrógeno en el citoplasma, resultando en la reducción del pH en el citoplasma o el uso de ATP para resistir la disminución del pH y mantener la homeostasis, causando que la célula reduzca o frene el crecimiento (Queiroz *et al.*, 2013). Buffer propiónico ácido base es un producto fácil de manejar y no corrosivo; el ácido propiónico no disociado tiene propiedades antimicrobianas, la fracción del ácido



propiónico no disociada depende del pH, actuando de forma competitiva con los aminoácidos por el espacio de los sitios activos de las enzimas (Kung, 2010).

### ***Antibióticos y bacteriostáticos.***

Entre los más utilizados está el formol (solución de formaldehído al 38%) (Shimada, 1986). Se ha comenzado a utilizar formalina al 40% en agua, la cual se puede utilizar sola o combinada con algún ácido como el sulfúrico o el fórmico, el formaldehído se combina con la proteína protegiéndola de la hidrólisis tanto del rumen como del silo, posteriormente la proteína es liberada en condiciones ácidas del abomaso digiriéndose en el intestino delgado, sin embargo, el dosificar el formaldehído a altas concentraciones (que superen los 50g de formaldehído/kg de proteína) afecta la actividad microbiana normal del rumen, reduciendo la digestibilidad y la ingestión de materia seca (McDonald *et al.*, 1995).

### ***Microorganismos.***

Los inóculos bacterianos promueven una fermentación más rápida y más eficiente (Bolsen *et al.*, 1995; Koc *et al.*, 2008; Nkosi *et al.*, 2012), incrementando la concentración de ácido láctico (Nkosi *et al.*, 2011) y por lo tanto acelerando la disminución del pH (Koc *et al.*, 2008; Nkosi *et al.*, 2011). La eficiencia de la fermentación de los inóculos en el forraje depende de la interacción de las especies microbianas en el inóculo con la población microbiana y los componentes químicos del forraje (Addah *et al.* 2010). Se utilizan principalmente bacterias homofermentativas (Bolsen *et al.*, 1995; Koc *et al.*, 2008), que han resultado muy efectivas para mejorar las fermentaciones de los ensilados al degradar más rápidamente los carbohidratos solubles en ácido láctico. Estos aditivos, se han utilizado a lo largo del siglo 20 para mejorar la preservación del ensilaje al asegurar que las bacterias lácticas dominen la fase de fermentación (Bolsen *et al.*, 1995). Se recomienda utilizar dichas bacterias a una dosis de 100,000 a 1'000,000 UFC/g de cultivo recién segado (Bolsen *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 1995). Los inóculos de bacterias ácido lácticas son usados a menudo para mejorar la fermentación ácido láctica, preservando mejor el material ensilado (Jalč *et al.*,

2009; Addah *et al.* 2010). Las bacterias homolácticas utilizan de manera más eficiente los carbohidratos solubles del forraje aumentando la posibilidad de tener un ensilado bien conservado, sobre todo si el cultivo no contiene suficientes bacterias (McDonald *et al.*, 1995). Se han usado bacterias que producen compuestos específicos con actividad antifúngica durante el ensilado, como en el caso de *Propionibacteria acidilactici*; sin embargo, esta no resiste bien las condiciones de acidosis, y presenta un crecimiento lento (Kung *et al.*, 2007). Diversos estudios a nivel de laboratorio y de campo, han mostrado que los inoculantes microbianos mejoraron consistentemente la eficacia de conservación así como el valor nutritivo del material ensilado (Bolsen *et al.*, 1995). En el caso de los inóculos microbianos a base de bacterias homofermentativas, han sido usados para mejorar la eficiencia de la fermentación del ensilaje (Reich & Kung, 2010; Kung, 2010). Las bacterias homofermentativas actúan convirtiendo los carbohidratos solubles en ácidos orgánicos principalmente ácido láctico, resultando en una rápida acidificación del ensilaje promoviendo la inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables. Por su parte las bacterias heterofermentativas se utilizan para mejorar la estabilidad aeróbica degradando los nutrientes después de la apertura del ensilaje (Nkosi *et al.*, 2011) debido a que fermentan los carbohidratos solubles en ácidos antifúngicos como el acético y propiónico, que inhiben el crecimiento de hongos causantes del deterioro (Queiroz *et al.*, 2013), en el caso de *Lactobacillus buchneri*, esta es una bacteria heteroláctica, la cual mejora la estabilidad aeróbica del ensilaje mediante la producción anaerobia de ácido acético (Reich & Kung, 2010; Kung, 2010). Para mejorar la calidad de la fermentación y disminuir las pérdidas de materia seca durante el proceso de ensilaje, a menudo se utilizan bacterias ácido lácticas homofermentativas como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus spp* (Guo *et al.*, 2013; Bolsen *et al.*, 1995; Jalč *et al.*, 2009; Koc *et al.*, 2008); asimismo, también se llega a usar *Lactobacillus acidophilus* (Jalč *et al.*, 2009). Los inóculos bacterianos tienen ciertas ventajas sobre otros aditivos entre las que se incluyen la seguridad en el manejo (Bolsen *et al.*, 1995; Jalč *et al.*, 2009; Koc *et al.*, 2008), no hay residuos o problemas ambientales (Bolsen *et al.*,

1995; Jalč *et al.*, 2009; Koc *et al.*, 2008), los bajos costos y que se utilizan dosis bajas por tonelada de forraje picado (Bolsen *et al.*, 1995); asimismo, los inóculos microbianos son fáciles de usar (Jalč *et al.*, 2009; Koc *et al.*, 2008), no corroen las maquinarias (Koc *et al.*, 2008) y son considerados productos naturales (Jalč *et al.*, 2009; Koc *et al.*, 2008). Sin embargo, la utilización de bacterias ácido lácticas a menudo reduce la estabilidad aeróbica del ensilaje debido a la insuficiente producción de ácidos grasos volátiles (Nkosi *et al.*, 2011; Reich & Kung, 2010).

### ***Enzimas.***

Si bien, los inóculos microbianos del ensilado mejoran la calidad de la fermentación del forraje, sus efectos sobre la degradación de la fibra no siempre consistente debido a que las bacterias del ácido lácticas no pueden utilizar eficazmente la fibra como fuente de energía para producir ácido láctico (Nkosi *et al.*, 2012). Es por esto que actualmente algunos aditivos para ensilados contienen (además del inóculo de las cepas adecuadas de bacterias ácido lácticas) enzimas (como celulasas y hemicelulasas), las cuales degradan las paredes celulares, liberando los azúcares que quedan disponibles para ser fermentados por las bacterias ácido lácticas (McDonald *et al.*, 1995; Ozduven *et al.*, 2010). Estas enzimas son más efectivas si se añaden a hierba tierna ensilada con un bajo contenido de MS (McDonald *et al.*, 1995). Las enzimas fueron originalmente agregadas para mejorar las características fermentativas y el rendimiento animal (Ozduven *et al.*, 2010). La adición de enzimas al forraje al momento de ensilar, ha reportado la degradación de la pared celular incrementando la disponibilidad de carbohidratos solubles (Nkosi *et al.*, 2012).

### ***Ingredientes específicos.***

Son utilizados para contrarrestar alguna deficiencia que pueda poseer el forraje a ensilar (Shimada, 1990), entre los cuales se encuentran pulpa de cítricos, remolacha o heno picado los cuales absorben la humedad reduciendo las pérdidas por drenaje en el silo, también se pueden agregar granos molidos de maíz, cebada o avena, mazorcas de maíz molidas con grano y olote, mezclas de granos molidas

y pulpas de cervecería o destilería (Moore, 1985), la melaza (que fue uno de los primeros aditivos empleados para ensilados como fuente de azúcares) se ha comprobado que su utilización aumenta los contenidos de materia seca y ácido láctico. Además, también ayuda en la disminución del pH y de los niveles de amoníaco en los ensilados (McDonald *et al.*, 1995). En general ensilajes a los cuales se han agregado alimentos como preservativos, son consumidos por los animales en mayor cantidad aunque esto no aumente el consumo real de materia seca del forraje (Moore, 1985).

### ***Sales minerales.***

Sirven para retrasar el proceso fermentativo debido a la capacidad amortiguadora de compuestos como cloruros, sulfatos y carbonatos (Shimada, 1990).

### ***Álcalis fuertes.***

Los más utilizados son los hidróxidos de sodio y potasio, los cuales inhiben el crecimiento de levaduras, principalmente en ensilajes ricos en carbohidratos simples como la caña de azúcar, subproductos de piña etc. (Shimada, 1990).

## **TIPOS DE FORRAJE QUE SE PUEDEN ENSILAR**

A pesar de que casi todos los cultivos pueden conservarse como ensilado, los más empleados son las gramíneas, las leguminosas y las plantas de cereales completas, principalmente el maíz (McDonald *et al.*, 1995), siendo el ensilado de cebada y de maíz los principales forrajes usados en las dietas de corrales de engorda en Norte América, en la parte occidental de Canadá, la cebada ha sido el cultivo tradicional para ensilar (Addah *et al.* 2010). En el caso de los forrajes de gramíneas y leguminosas, estos se recomienda ensilar en el primer corte (Moore, 1985). Es necesario que el material que se vaya a ensilar contenga un adecuado contenido de humedad (25-35%), carbohidratos fácilmente fermentados, nutrientes y que pueda ser fermentado adecuadamente (Cullison, 1983). En caso que la disponibilidad de agua sea un factor limitante para la producción de cultivos como

el maíz, el triticale resulta una opción como cultivo forrajero (pudiendo tener rendimientos de 9 a 11 toneladas de materia seca/ hectárea) (Ozduven *et al.*, 2010). Por su parte la alfalfa y otras leguminosas son por lo general difíciles de ensilar debido al bajo contenido de azúcares y la alta capacidad buffer, sin embargo la adición de un inoculante ayuda a asegurar que la mayor cantidad de sustrato disponible sea convertido en ácido láctico, con lo cual se eliminaría parte del riesgo de tener un ensilaje mal conservado (Bolsen *et al.*, 1995).

### **Maíz**

Actualmente existe una gran variedad de tipos de maíz (*Zea mays*) cuyos granos pueden presentar distintos colores (amarillo, blanco o rojo), en el caso del maíz amarillo este contiene un pigmento llamado criptoxantina, el cual funciona como precursor de la vitamina A; en los Estados Unidos es la variedad amarilla la más utilizada para la alimentación animal, sin embargo debido a que los granos pigmentados tienden a teñir la carne en el Reino Unido se prefiere el maíz blanco para el cebo de ganado bovino (McDonald *et al.*, 1995). Las variedades de ciclo largo resistentes a enfermedades suelen producir más forrajes que las variedades de ciclo corto (Sprague, 1985).

Es el cultivo que más se utiliza para ensilar (Cullison, 1983; Nkosi *et al.*, 2011), siendo su ensilaje el principal componente de las dietas de bovinos productores de leche debido a la alta concentración de energía por unidad de área, alta palatabilidad. Se cultiva 10 veces más maíz que sorgo para ser ensilado (Cullison, 1983), ya que entre muchas otras cosas, tiene baja capacidad buffer y una alta concentración de carbohidratos solubles (Nkosi *et al.*, 2011). Además, resulta fácil la mecanización y almacenaje y presenta una alta uniformidad del valor alimenticio (Ozduven *et al.*, 2010). Presenta buenos rendimientos, los cuales pueden ir de 25 a 45 ton/ha de forraje verde, incluso pueden llegar a 62 ton/ha (Sprague, 1985). Sin embargo, en suelos arenosos propensos a la sequía y en años con precipitaciones insuficientes, el rendimiento del maíz es muy bajo (7-8 toneladas de materia seca por hectárea) (Ozduven *et al.*, 2010); asimismo el ensilaje de maíz es muy sensible al deterioro aeróbico debido a las altas

concentraciones de sustrato como almidón y ácidos orgánicos los cuales son utilizados por microorganismos indeseables (Nkosi *et al.*, 2011).

El maíz es una buena fuente de energía digestible, con un bajo contenido de proteínas, las cuales son de baja calidad. Asimismo, el maíz contiene aproximadamente 730 g de almidón/kg MS, el cual tiene una tasa de paso muy lenta por el rumen en relación a otros granos, sin embargo una administración elevada de este almidón hace que llegue a intestino delgado donde es digerido y absorbido en forma de glucosa; una cocción de los almidones durante el proceso genera que se fermenten rápidamente en el rumen; de igual forma, el maíz contiene una cantidad de fibra escasa y un alto nivel en energía metabolizable. El maíz contiene aproximadamente entre 40 y 60g/kg MS de aceite siendo rico en ácido linoléico, el cual tiende a producir grasa blanda en los animales que lo consumen, sin embargo el ácido linoléico tiene un papel importante controlando el tamaño de los huevos de gallina (McDonald *et al.*, 1995). En general, el maíz contiene entre 90 y 140 g/kg MS de proteína cruda, aunque existen variedades con niveles superiores (McDonald *et al.*, 1995), en el sur de Alberta, el rendimiento de materia seca por hectárea del maíz suele ser el doble que el de la cebada (Addah *et al.* 2010). El maíz contiene dos tipos de proteína que son la zeína (en el endospermo), la cual es deficiente en aminoácidos como triptófano y lisina; y la glutamina (en el endospermo y el germen), la cual se encuentra en menor cantidad que la zeína, sin embargo esta es rica en aminoácidos indispensables, sin embargo, actualmente existen variedades de maíz como el opaco-2 la cual presenta un alto contenido en lisina gracias a una relación zeína:gluteína diferente a la del maíz normal (McDonald *et al.*, 1995).

El maíz puede utilizarse de diferentes formas, cosechando las mazorcas en un estado de maduración avanzado, haciendo un ensilaje de rastrojo con las cañas para lo cual es necesario agregar agua al silo; posterior a las cosechas de mazorcas con máquinas picadoras, suele hacerse pastar vacas y cerdos por los campos; durante el verano puede cortarse maíz verde para casos de emergencia (Sprague, 1985), o bien puede hacerse un ensilaje en el grado de grano lechoso utilizando toda la planta y la mazorca, resultando en un ensilaje de calidad

insuperable (Cullison, 1983), cuando el maíz es cosechado en un estado de madurez de la línea de leche de 2/3, este presenta bajos niveles de carbohidratos solubles (3-10%) respecto a la cebada cosechada en un estado óptimo de maduración (presentando 10-20% de carbohidratos solubles) (Addah *et al.* 2010).

## **OBJETIVO**

Evaluar el efecto de la adición de dos agentes microbianos (*Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*) a diferentes dosis, así como combinados entre ellos y adicionados con una enzima microbiana, sobre la calidad química del ensilaje de maíz a diferentes tiempos de almacenamiento.

## **HIPÓTESIS**

La inclusión de inóculos microbianos y enzimas microbianas en el proceso de ensilaje de maíz tiene un efecto estabilizador de la composición química del material ensilado.

## **JUSTIFICACIÓN**

El incremento en el costo de los insumos utilizados para la alimentación del ganado, así como la necesidad de conservar el forraje para su aprovechamiento a lo largo del año, han hecho necesario el buscar técnicas alternativas para su conservación. El ensilaje permite conservar el forraje verde pero puede optimizarse el proceso con el empleo de aditivos como los inóculos microbianos que pueden mejorar la conservación y la calidad química de los ensilajes.



## METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Juriquilla, Qro. Se empleó forraje de maíz de variedad criollo, de ciclo intermedio con una edad al momento del corte de 55 días aproximadamente proporcionado por el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, en Ajuchitlán, Qro.

### TRATAMIENTOS:

Para el estudio fueron evaluados 7 tratamientos, los cuales se inocularon al momento de ensilar el maíz picado; dichos tratamientos fueron: T1) control, sin inóculo; T2) inóculo de *Lactobacillus brevis* (100,000 UFC/g); T3) inóculo de *L. plantarum* (100,000 UFC/g); T4) combinación de T2+T3; T5) T4 + Enzima microbiana (ENZ, 1640 Unidades/kg); T6) *L.brevis* + *L. plantarum* (en dosis cada uno de 50,000 UFC/g), y T7) T6+EM (1640 Unidades/kg). Todos los tratamientos se ensilaron por triplicado y fueron abiertos a los 0, 15, 30 y 90 días. (Cuadro 3). El proceso de ensilado se hizo en dos días consecutivos (dos bloques), conservándose el material fresco en refrigeración hasta el momento del ensilaje.

### PROCESO DE ENSILADO:

El maíz picado fue ensilado en microsilos de laboratorio contruidos de material de PVC hidráulico (10 cm de diámetro x 30 cm de alto) provistos con una tapadera de hule industrial grueso conteniendo una válvula Bunsen y conservados a 23°C. Para el ensilaje del forraje y su inoculación con el tratamiento correspondiente, se pesaron 1.5 kg de forraje de maíz picado, el cual se roció de forma manual con la correspondiente cantidad de inóculo, el cual previamente fue disuelto en agua desionizada. Para lo cual, se disolvieron 160 mg de cada inoculante en 30 ml de agua desionizada en frascos de plástico con válvula de aspersión, posteriormente esto se rociaba sobre 1.5 kg de maíz picado para ensilar. Una vez que se roció el inóculo y se mezcló a fondo, el material se colocó en microsilos previamente identificados y pesados; el material se comprimió

mecánicamente con un dispositivo de embalaje a base de pistones de aire diseñado por la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, con el cual se comprimían simultáneamente dos microsilos con la misma fuerza de presión (Figura 1).



**Figura 1. Inoculación del forraje de maíz: a) aspersión del inóculo; b) llenado del microsilo, y ligera compresión manual del forraje dentro del microsilo y c) compactación mecánica de los microsilos.**

Posteriormente cada microsilo se cerró herméticamente y se les inyectó CO<sub>2</sub> a través de la válvula Bunsen.

### **ANÁLISIS DE LABORATORIO:**

Al tiempo correspondiente de ensilado, cada microsilo se pesó, se abrió y se tomaron muestras para determinación de pH (AOAC, 1990), se tomó una muestra la cual se molió en un molino Wiley con una criba de 2mm utilizando hielo seco y se guardó a -20°C para determinar materia seca por arrastre con tolueno (MStol), para nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) (AOAC, 1990) y para AGV's mediante la técnica de cromatografía de gases (Roberts *et al.*, 2007). Asimismo se tomó otra muestra, la cual se secó en una estufa a 55°C (MS a 55°C, %) (AOAC, 1990) y se molió utilizando también una criba de 2mm, para posteriormente analizar materia seca (MS) por estufa a 100°C, proteína cruda (PC) (AOAC, 1990), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Robertson y Van Soest, 1981).

**Cuadro 3. Descripción de los tratamientos experimentales.**

Tratamiento (Inóculo)*	Tiempo (Días)	Descripción
Control	0	Sin Inóculo
	15	
	30	
	90	
Brev 100	0	<i>Lactobacillus brevis</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco
	15	
	30	
	90	
Plant 100	0	<i>L. plantarum</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco
	15	
	30	
	90	
P+B 100	0	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>Lactobacillus brevis</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco
	15	
	30	
	90	
P+B+Enz	0	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>Lactobacillus brevis</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana (ENZ, 1640 Unidades/kg)
	15	
	30	
	90	
P+B 50	0	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>Lactobacillus brevis</i> a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco
	15	
	30	
	90	
P+B 50 + Enz	0	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>Lactobacillus brevis</i> a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana (ENZ, 1640 Unidades/kg)
	15	
	30	
	90	

\*Todos los tratamientos se hicieron por triplicado.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados fueron analizados de acuerdo a un diseño por bloques al azar con un arreglo factorial 7 x 4, siendo los factores los 7 diferentes tratamientos (incluyendo los dos diferentes inóculos, *L. plantarum* y *L. brevis*, en dos concentraciones cada uno y sus combinaciones, más la combinación de ambos inóculos con y sin enzima), y los cuatro tiempos de conservación (0, 15, 30 y 90 días). El bloque se definió por el día del ensilaje. Las variables de respuesta evaluadas fueron MS 55°C, MS100°C, MStol, pH, N-NH<sub>3</sub>, PC, FDN y FDA. Se emplearon los procedimientos PROC GLM y LSMEANS del paquete estadístico SAS (SAS, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar los cambios en la calidad química del ensilado de maíz al incluir dos tipos de inóculos a distintas concentraciones, así como combinados entre ellos y adicionando una enzima microbiana.

La materia seca a 55°C fue similar entre los tratamientos evaluados a través de todos los tiempos de conservación, siendo la media ( $\pm$  error estándar) de  $40.51 \pm 3.20\%$ . En el Cuadro 4 se presentan las medias mínimas cuadráticas de la materia seca a 55°C de acuerdo al tipo de aditivo y el tiempo de almacenamiento. El porcentaje de materia seca a 55°C del maíz que se ensiló al tiempo cero, independientemente del tratamiento, fue de  $43.45 \pm 0.66$ , el cual fue ligeramente mayor al que recomiendan otros autores (Shimada, 1986 y 1990; Queiroz *et al.*, 2013) de 34 a 28% de MS al momento de ensilar. Guo *et al.* (2013) mencionan que la fermentación de los ensilajes de pastos con contenidos de materia seca por encima del 40% y sin adicionar inóculos, a menudo resultan en la producción de etanol y una alta pérdida de materia seca después del ensilado; sin embargo, en el presente estudio donde el forraje que se utilizó fue ensilado con un 43.45% de MS, no se presentó pérdida de materia seca. Kung y Ranjit (2001), documentan la utilización de plantas de cebada con un porcentaje de 39.4% de materia seca, el cual es muy parecido al porcentaje del maíz ensilado en el presente estudio, quienes encontraron un ensilaje de buena calidad, con y sin la inclusión de inóculos. Cullison (2003) explica que cuando el material a ensilar presenta más del 35% de materia seca, este no se va a poder compactar muy bien, permitiendo el desarrollo de hongos como resultado del excesivo oxígeno que queda atrapado, principalmente en silos no herméticos, lo cual no fue un problema en el presente estudio, donde a pesar del alto contenido de materia seca del forraje, la compactación del mismo fue eficiente evitándose así la presencia del oxígeno presente pero además a los microsilos se les inyectó CO<sub>2</sub> al momento de taparlos. Posteriormente se pudieron observar ciertas variaciones en el porcentaje de materia seca a 55°C en los demás días de almacenamiento, las cuales no fueron diferentes significativamente ( $P>0.1$ ) (Figura 2). A los 90 días de almacenaje,

Kung *et al.* (2007) obtuvieron valores de materia seca a 60°C entre 71.2 a 71.7%, los cuales se encuentran muy por debajo de los obtenidos durante el presente estudio al mismo tiempo de almacenaje, donde el promedio ( $\pm$  error estándar) de materia seca a los 90 días de almacenaje fue de  $96.49 \pm 1.20$ ; Sin embargo tanto en el estudio de Kung *et al.* (2007) como en el presente estudio, estos resultados no fueron estadísticamente diferentes ( $P > 0.1$ ).

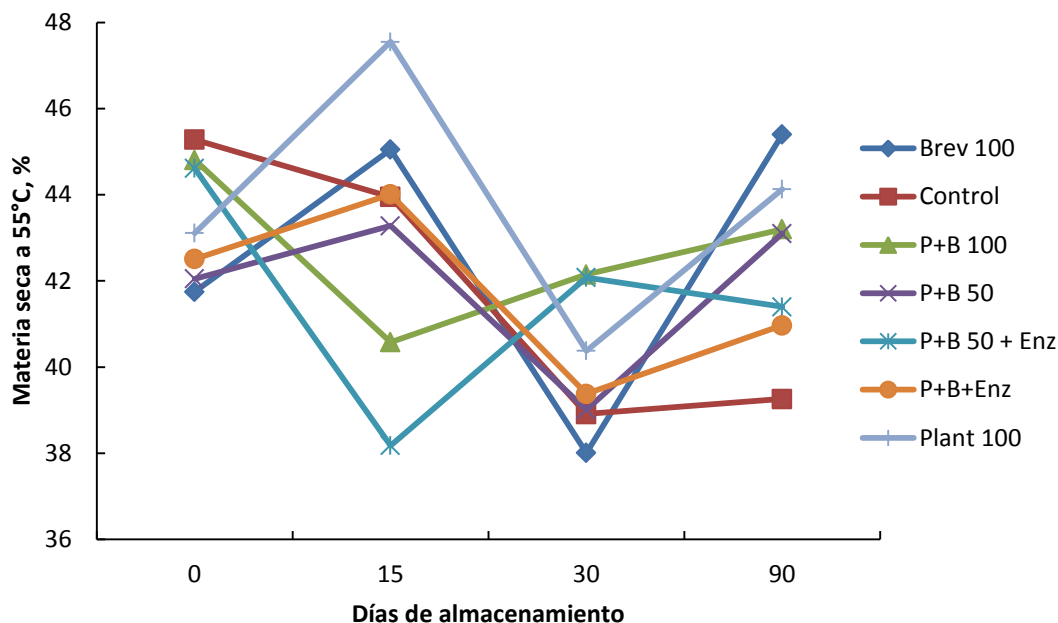
Por su parte Guo *et al.* (2013) utilizaron inóculos microbianos (*Lactobacillus plantarum* MTD 1 y *Lactobacillus plantarum* MTD1 combinado con *Lactobacillus buchneri* 40788) en ensilaje de Festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb) y Festuca de pradera (*Festuca pratensis* Huds) a una dosis de 1,000,000 UFC/g de forraje, de acuerdo con el contenido de materia seca del forraje fresco, habiendo obtenido porcentajes de MS a 55°C de 34.6 y 48.7 en aquellos forrajes de primer corte que fueron ensilados con un 40 y un 50% de MS, mientras que para los de segundo corte fueron de 44.1 y 48.2%. En el presente estudio se empleó una dosis de 100,000 UFC/g de forraje en base húmedo que originalmente tenía una media ( $\pm$  error estándar) de  $43.45 \pm 0.66\%$  de MS, muy similar a lo hecho por otros autores (Queiroz, *et al.* 2013; Kung y Ranjit 2001; Kung *et al.*, 2007).

No se encontró diferencia ( $P > 0.1$ ) por efecto del tratamiento para materia seca a 100°C. En la Figura 3 se observan las medias ( $\pm$  error estándar) para cada uno de los aditivos durante todos los tiempos de estudio.

**Cuadro 4. Medias mínimas cuadráticas y error estándar de la media del porcentaje de materia seca y pH de ensilaje de maíz con y sin la inclusión de inóculos microbianos<sup>1</sup>.**

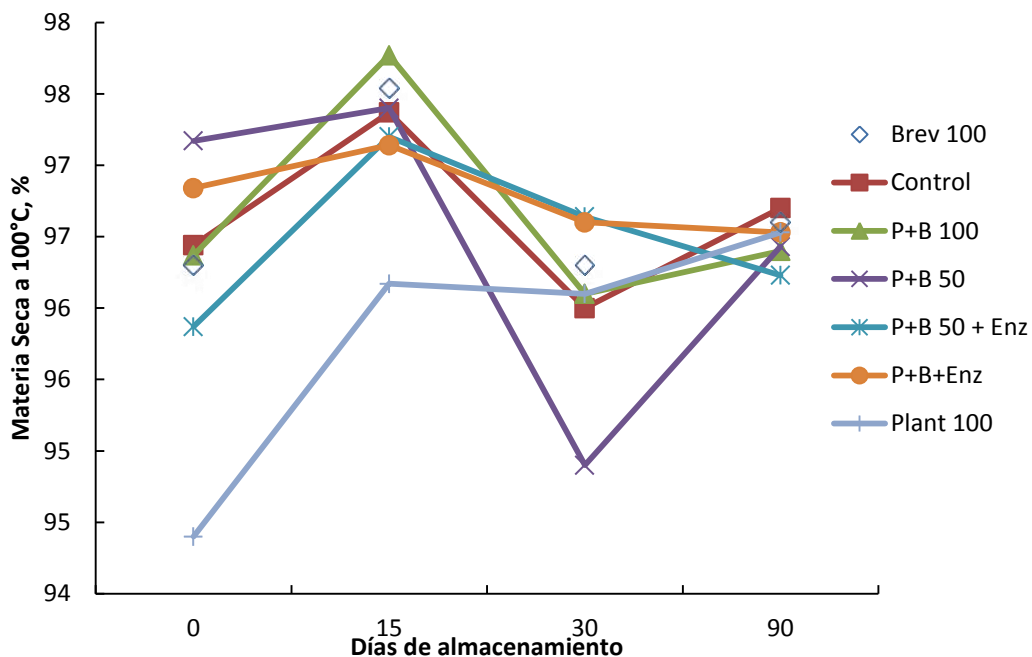
Tratamiento (Inóculo)*	Tiempo (Días)	Materia seca 55°C	Materia seca a 100°C	Materia seca arrastre con Tolueno	pH
Control	0	45.28 ± 1.47	96.44 ± 0.55	43.41 ± 1.92	6.25 ± 0.22
	15	43.95 ± 1.47	97.37 ± 0.55	42.01 ± 1.92	4.24 ± 0.22
	30	38.91 ± 1.47	96 ± 0.55	36.98 ± 1.92	4.36 ± 0.22
	90	39.26 ± 1.42	96.7 ± 0.53	40.47 ± 1.85	4.21 ± 0.21
Plant 100	0	43.11 ± 1.47	94.4 ± 0.55	44.14 ± 1.92	5.93 ± 0.22
	15	47.55 ± 1.47	96.17 ± 0.55	37.28 ± 1.92	4.24 ± 0.22
	30	40.38 ± 1.47	96.1 ± 0.55	40.31 ± 1.92	4.29 ± 0.22
	90	44.13 ± 1.42	96.5 ± 0.53	45.03 ± 1.85	4.10 ± 0.21
Brev 100	0	41.75 ± 1.47	96.3 ± 0.55	44.88 ± 1.92	5.83 ± 0.22
	15	45.05 ± 1.47	97.54 ± 0.55	42.38 ± 1.92	4.12 ± 0.22
	30	38.01 ± 1.47	96.3 ± 0.55	37.31 ± 1.92	4.55 ± 0.22
	90	45.40 ± 1.42	96.6 ± 0.53	42.30 ± 1.85	4.08 ± 0.21
P+B 100	0	44.81 ± 1.47	96.37 ± 0.55	44.78 ± 1.92	5.98 ± 0.22
	15	40.58 ± 1.47	97.77 ± 0.55	40.58 ± 1.92	4.53 ± 0.22
	30	42.15 ± 1.47	96.1 ± 0.55	40.64 ± 1.92	4.28 ± 0.22
	90	43.20 ± 1.42	96.4 ± 0.55	41.63 ± 1.85	4.07 ± 0.21
P+B+Enz	0	42.51 ± 1.47	96.84 ± 0.55	45.68 ± 1.92	5.94 ± 0.22
	15	44.01 ± 1.47	97.14 ± 0.55	39.91 ± 1.92	4.29 ± 0.22
	30	39.38 ± 1.47	96.6 ± 0.55	39.64 ± 1.92	4.30 ± 0.22
	90	40.97 ± 1.42	96.53 ± 0.53	41.17 ± 1.85	4.11 ± 0.21
P+B 50	0	42.05 ± 1.47	97.17 ± 0.55	46.08 ± 1.92	5.83 ± 0.22
	15	43.28 ± 1.47	97.4 ± 0.55	41.34 ± 1.92	4.28 ± 0.22
	30	39.01 ± 1.47	94.9 ± 0.55	37.64 ± 1.92	4.61 ± 0.22
	90	43.10 ± 1.42	96.43 ± 0.53	39.63 ± 1.85	4.07 ± 0.21
P+B 50 + Enz	0	44.61 ± 1.47	95.87 ± 0.55	47.01 ± 1.92	6.38 ± 0.22
	15	38.18 ± 1.47	97.2 ± 0.55	40.14 ± 1.92	4.25 ± 0.22
	30	42.08 ± 1.47	96.64 ± 0.55	40.98 ± 1.92	4.34 ± 0.22
	90	41.40 ± 1.42	96.23 ± 0.53	38.50 ± 1.85	4.15 ± 0.21

<sup>1</sup> Los valores representan las medias mínimas cuadradas (± error estándar). Control= Sin inóculo; Brev 100 = *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En = Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50=Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz=Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg.



**Figura 2. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca a 55°C de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

Al momento de ensilar, el material contenía un porcentaje de MS a 100°C de 96.20% (3.8% humedad), lo cual difiere con lo observado por Kung (*et al.*, 2007), quienes al momento de ensilar utilizaron maíz cosechado con un 73% y 75% de materia seca (27- 25% humedad), pero su estudio estaba enfocado a maíz con alta humedad. En ensilajes de silo bunker de ryegrass, el aumento en el contenido de MS a 100°C de 18 a 30 por ciento sin aditivos, tuvo una influencia beneficiosa sobre la fermentación (Guo *et al.*, 2013).

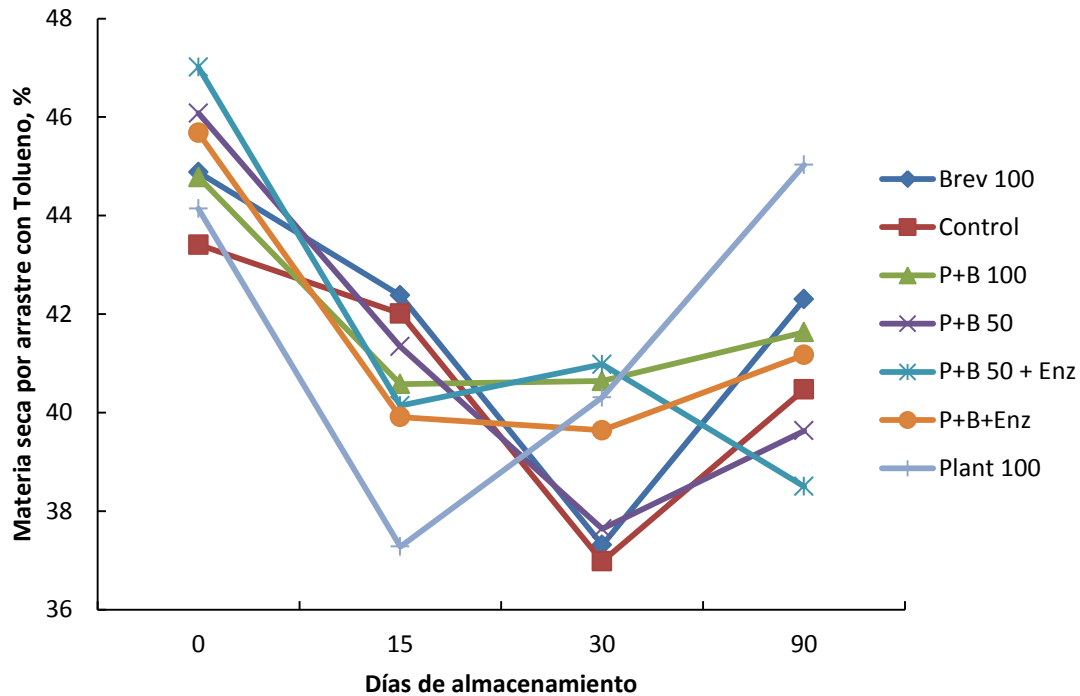


**Figura 3. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca a 100°C de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

Debido a que algunos productos de la fermentación del material ensilado son ácidos grasos volátiles y otros compuestos volátiles, los cuales también deben considerarse como parte de la materia seca del material, la técnica de secado en estufa para determinar la materia seca, subestima el valor real de la materia seca debido a que esta técnica se basa en la evaporación del agua de una muestra de alimento, dejando únicamente la muestra seca, sin embargo, también llega a quitar dichos compuestos volátiles tomándolos en el cálculo final como humedad perdida. Por lo tanto se utiliza la técnica de determinación de materia seca por arrastre con tolueno, la cual separa únicamente el agua de la muestra, la atrapa en un matraz especial para su posterior cuantificación y considera los compuestos volátiles. La MS determinada mediante la técnica de arrastre con tolueno, tampoco se vio afectada por efecto del aditivo, siendo similar en todos los tiempos



evaluados, presentando una media ( $\pm$  error estándar) de  $40.51 \pm 3.20\%$ , lo cual puede deberse a la poca cantidad de compuestos volátiles (nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles) obtenidos en los ensilajes. En el Cuadro 4 se presentan las medias mínimas cuadradas de acuerdo al tipo de aditivo y el tiempo de almacenamiento de la MS por arrastre con tolueno (Figura 4).



**Figura 4. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca por arrastre con tolueno de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

Respecto a las pérdidas por materia seca, McDonald (1995) indica que existen distintos tipos, entre los cuales se presenta por oxidación, por fermentación y por líquidos, sin embargo, bajo las condiciones del presente estudio, debido al adecuado proceso de ensilaje y buen sellado de los microsilos, no se presentó ningún tipo de pérdida por efecto de la oxidación ya que el producto aparentemente nunca entró en contacto con el aire. Sin embargo

Cárdenas *et al.* (2003), reportan un aumento en la materia seca significativo ( $P < 0.05$ ) en ensilajes de pasto Taiwán (*Pennisetum purpureum* variedad Taiwán 144A) al incluir diferentes especies arbóreas en distintas proporciones (15, 30 y 45%) tomando como base el Pasto Taiwán, observando una tendencia cuadrática conforme incrementaban el porcentaje de inclusión de la especie arbórea y mencionan que el contenido en materia seca puede variar dependiendo de la concentración de la materia seca de las especies utilizadas.

No se presentaron diferencias significativas para el pH por efecto del tratamiento ( $P > 0.001$ ). Sin embargo, sí se pudo observar un efecto debido al tiempo de ensilado, del tiempo cero a los 15 días de ensilado, lo cual era de esperarse debido al proceso de fermentación que sufrió el forraje durante el inicio de la conservación. En el Cuadro 4 se presentan las medias mínimas cuadráticas de acuerdo al tipo de aditivo y el tiempo de almacenamiento del pH. La media mínima cuadrada del pH del forraje al tiempo cero fue de 6.02, y se fue modificando a 4.27, 4.39, y 4.11 a los 15, 30 y 90 días, respectivamente. La media general para pH ( $\pm$  error estándar) fue de  $4.67 \pm 0.37$ , el cual es muy similar a lo encontrado por Cárdenas *et al.* (2003) quienes reportan un pH inferior a 4.2 en pasto Taiwán combinado con diferentes especies arbóreas. Moore (1985) indica que para ensilajes de buena calidad, el pH deberá tener un valor inferior a 4.5. Queiroz *et al.* (2013) mencionan que un pH inferior a 4 es indicativo de un adecuado proceso de fermentación por parte del forraje. Guo *et al.* (2013) al ensilar Festuca de primer corte con diferentes niveles de materia seca de 17.9%, 24.9, 34.6 y 48.7%, después de 60 días observaron que el valor de pH se incrementó de 4.83, 4.93, 5.09 y 5.10 respectivamente ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, al ensilar Festuca de segundo corte, a los 60 días observaron una disminución en el pH de 4.83, 4.73, 4.48 y 4.56, respectivamente, conforme los forrajes ensilados presentaban un mayor contenido de materia seca de 29.1, 36.3, 44.1 y 49.2% ( $P > 0.05$ ). Kung y Ranjit (2001) ensilaron cebada incluyendo diferentes tipos de inóculos, tanto microbianos como enzimas, encontrando que a los 69 días de almacenamiento el pH disminuyó significativamente en cada uno de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) con valores al tiempo cero que iban desde 6.1 hasta 5.8, a

pH de 4.07 a los 60 días de ensilaje. Guo *et al.* (2013), reportan reducciones del pH similares a los del presente estudio, en ensilaje de zacate *Festuca* tratado con *Lactobacillus plantarum* o con *Lactobacillus buchneri*. Kung *et al.* (2007) reportan que el pH final de ensilaje de maíz con alta humedad tratado con *Lactobacillus buchneri* de 4.23 y otro tratado con *L.* adicionado con enzimas (xilanasa,  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$  glucanasa) de 4.25, fueron mayores ( $P < 0.05$ ) que los silos no tratados de 4.01. Koc *et al.* (2008), al ensilar maíz observaron que después de 7 días, el grupo control presentaba un pH de 3.96, el grupo tratado con dos especies de bacterias ácido lácticas homofermentativas (*L. plantarum* y *Pediococcus acidilactici*) a una dosis de 500 000 UFC/g combinadas con una enzima (Amilasa) a una dosis de 0.15 gramos del inóculo en polvo presentó un pH de 3.91 (no presentando diferencias respecto al grupo control ni respecto a los dos grupos tratados  $P > 0.05$ ), el grupo tratado con las dos especies de bacterias homofermentativas a una dosis de 1 000 000 UFC/g adicionado con la enzima a una dosis de 0.30g del inóculo en polvo presentó un pH de 3.86, y el grupo tratado con las dos enzimas microbianas a una dosis de 2 000 000 UFC/g, adicionadas con una enzima a una dosis de 0.60g del inóculo en polvo presentó un pH de 3.86, siendo estos últimos dos diferentes al grupo control ( $P < 0.05$ ), todos estos son valores inferiores a los obtenidos en el estudio, debido a que ellos ensilaron forraje con un 22.92% de materia seca.

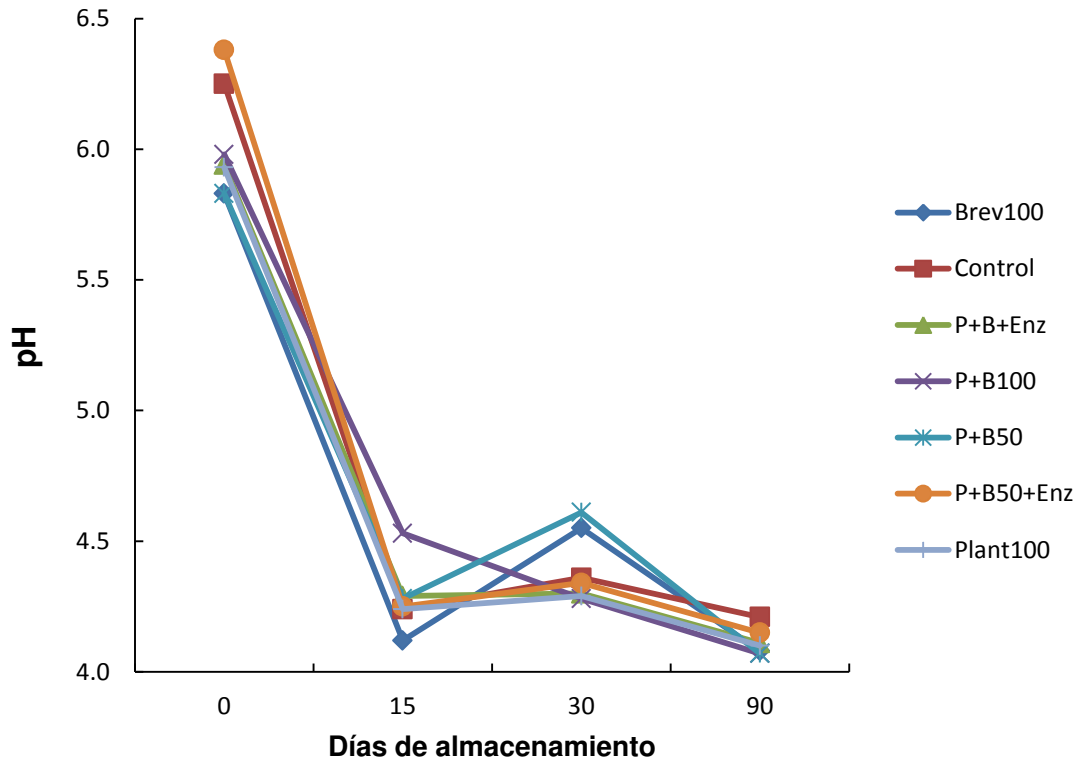
En la Figura 5 se puede apreciar la rápida disminución en el pH respecto al día 0, siendo este estadísticamente diferente ( $P < 0.001$ ) al resto de los días de almacenaje. Es importante notar la rápida disminución del pH ya que este controla las reacciones y la calidad del ensilado. Sin embargo, Queiroz *et al.* (2013) si observaron diferencia ( $P < 0.001$ ) siendo el grupo control (sin aditivos) el que presentó un menor pH (3.76) al 3<sup>er</sup> día post ensilaje y el tratamiento en el que combinó *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* a una concentración de 1000 000 UFC, obtuvo el mayor valor de pH siendo 3.92, a los 120 días de almacenamiento el maíz tratado con Benzoato de Sodio al 0.1% presentó el pH más bajo (3.67,  $P < 0.001$ ), en todos los casos estos valores se encuentran inclusive debajo de lo obtenido en el presente estudio.

Debido a que el pH tiene la función de regular la actividad microbiana no deseada McDonald en (1995) reporta que para el caso de gramíneas con una materia seca de 200g/kg un pH de 4 suele ser suficiente para conservar el cultivo adecuadamente siempre y cuando el cultivo permanezca cerrado y no penetre agua de lluvia. Por su parte Shimada (1986) indica que el pH ideal en un ensilaje al día 21 debe ser de 3.8-4.3, mientras que Cárdenas *et al.* (2003) mencionan un pH de 4.2 como valor aceptable en un proceso de ensilaje; en el presente estudio se puede observar que en todos los casos, el pH llegó a niveles cercanos a 4 a partir del día 15 y ahí se estabilizó, independientemente del tratamiento al que haya sido sometido. McDonald (1995) reporta que bacterias homofermentativas (como *Lactobacillus plantarum*) son más eficientes como productoras de ácido láctico a partir de las hexosas que las bacterias heterofermentativas (como *Lactobacillus brevis*). En el presente estudio, se observó que *Lactobacillus plantarum* presentó un pH ligeramente menor a *Lactobacillus brevis* (4.63 vs. 4.65), sin embargo estos resultados no fueron diferentes ( $P > 0.1$ ). Kung y Ranjit (2001), al adicionar un inóculo que contenía *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus petosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii* y enzimas en plantas de cebada observaron una disminución del pH al día 69 con respecto al grupo de plantas que no habían sido tratadas, difiriendo con los resultados observados en el presente estudio, donde no hubo diferencias entre tratamientos (incluyendo el control); sin embargo ellos al momento de ensilar tenían mayor humedad que en el caso del presente estudio.

El pH es uno de los principales indicadores de la calidad de un ensilaje. Si el pH indica un grado de acidez menor al que tenía el forraje antes de ser ensilado, esto quiere decir que la fermentación fue dominada principalmente por las bacterias productoras de ácido láctico, mientras que si el pH no cambia o se hace menos ácido, es un indicador de que no hay una completa anaerobiosis y algunos microorganismos aerobios están proliferando y pueden causar un deterioro serio en la conservación del forraje (Van Soest, 1994). Bolsen *et al.*, 1995 reportan que en estudios pasados, los inóculos bacterianos fueron benéficos en más del 90% de las comparaciones, donde los ensilajes inoculados

presentaron fermentaciones más rápidas y más eficientes, el pH fue menor particularmente durante los primeros 2 a 4 días post ensilaje.

La rápida disminución del pH en el presente estudio, indica que el proceso de conservación fue adecuado y que ninguno de los inóculos tuvo una influencia sobre el mismo en ninguno de los tiempos de ensilaje (Figura 5).



**Figura 5. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el pH de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

En el Cuadro 5 se presentan las medias mínimas cuadráticas de la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) y de proteína cruda (PC) de los ensilajes de acuerdo al tipo de aditivo y el tiempo de conservación. No se observaron diferencias significativas por efecto de los tratamientos para el porcentaje N-NH<sub>3</sub>, siendo la media ( $\pm$  error estándar) de 0.033 ( $\pm$  0.004). Estos valores coinciden con los encontrados por Guo et al. (2013) de 25.8 N-NH<sub>3</sub> (% del

total de N) en ensilajes de zacate Festuca al primer corte después de 60 días de almacenamiento inoculado con *L. plantarum* y *L. buchneri*, mientras que al ser inoculado con *L. plantarum*, obtuvieron valores de 22.6 N-NH<sub>3</sub> (% del total de N), contra un 18.4 N-NH<sub>3</sub> (% del total de N) obtenido en ensilajes no tratados, siendo todos estos diferentes (P<0.05), sin embargo, al ensilar zacate Festuca al segundo corte, el grupo control y el grupo tratado con la combinación de *L. plantarum* y *L. buchneri* fueron similares (P>0.05) con una media de 10.4 y 10.3 NH<sub>3</sub>-N (% del total de N) respectivamente, e iguales al grupo tratado con *L. plantarum*, el cual presentó una media de 9.8 N-NH<sub>3</sub> (% del total de N).

Kung y Ranjit (2001) reportan una disminución las concentraciones de nitrógeno amoniacal del 0.192% vs. 0.314% en ensilajes de cebada tratados con *L. buchneri*, *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propinebacterium freudenreichii*, y enzimas microbianas almacenado durante 69 días. Por su parte, Queiroz *et al.* (2013) reportan que al ensilar forraje de maíz fresco adicionado con distintos tratamientos, las concentraciones de nitrógeno amoniacal se redujeron en todos los casos con medias del 0.023 al 0.042 %.

Bolsen *et al.*, (1995) reportan que en estudios pasados, los inóculos bacterianos fueron benéficos en más del 90% de las comparaciones, donde ensilajes inoculados con bacterias presentaron menores valores de etanol y nitrógeno amoniacal respecto a los ensilajes no tratados.

Un aumento en la concentración de amoniaco, es indicativo de actividad proteolítica (Cárdenas *et al.*2003). Moore (1985) indica que en el caso de ensilajes de buena calidad, el contenido de nitrógeno amoniacal deberá ser bajo, mientras que para ensilaje de calidad deficiente establece de un 3 a 9%. En el presente estudio, independientemente del aditivo, las cantidades de nitrógeno amoniacal fueron inferiores a 0.06% (Cuadro 5). En la Figura 6 se presenta la dinámica de los cambios en el porcentaje del nitrógeno amoniacal de acuerdo a los tratamientos a través del tiempo.

En el Cuadro 5 se presentan las medias de contenido de proteína cruda de los ensilajes tratados con diferentes inóculos. No se observaron diferencias entre tratamientos en ninguno de los tiempos evaluados (P>0.1), siendo la media

general ( $\pm$  error estándar) de 7.16 ( $\pm$  0.62). Cárdenas *et al.* (2003) al ensilar pasto Taiwán con diferentes especies arbóreas, observaron que los ensilajes mixtos tendieron a tener mayor contenido de PC conforme aumentaba el porcentaje de adición de especies arbóreas (Pixoy, Tzalam, Jabín y Algarrobo y una mezcla de estas cuatro) a una razón de 15, 30 y 45%, presentando valores del 7.2% de PC por parte del grupo control hasta un 9.9% al adicionar la especie arbórea al 45%.

Por su parte, Queiroz *et al.* (2013) al adicionar *Lactobacillus buchneri* y *Pediococcus pentosaceus* al ensilaje de forraje fresco de maíz, encontraron mayores concentraciones de PC que el ensilaje control (8.62% vs 8.27%  $P < 0.01$ ). Asimismo, ensilajes tratados con benzoato de sodio al 0.1% presentaron las menores concentraciones de PC (7.91%) (Queiroz *et al.* 2013).

Kung *et al.* (2007), no encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos al inocular ensilajes de maíz con *Lactobacillus buchneri*, enzimas (xilanasas,  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$  glucanasa) ni la combinación de *L. buchneri* con dichas enzimas, sobre las concentraciones de proteína cruda de los ensilajes después de 90 días de almacenamiento, obteniendo una media de PC de 10.17% para el grupo control, 10.04% para el grupo tratado con *L. buchneri* y de 10.08% para el ensilaje recibiendo únicamente con dichas enzimas y de 9.95% para el tratamiento consistente en la combinación de estas enzimas con *L. buchneri*, aunque estos valores no fueron diferentes ( $P > 0.01$ ).

En el caso de ensilajes de leguminosas, los cuales son más altos en nitrógeno total, es posible disminuir la proteólisis y por lo tanto la producción de amoníaco utilizando especies con contenidos altos de materia seca que logran una rápida disminución del pH en el ensilaje (Cárdenas *et al.*, 2003). En el presente estudio la actividad proteolítica aparentemente fue muy baja, ya que los valores de proteína cruda se mantuvieron estables durante todo el proceso de fermentación, sin presentar diferencias significativas ( $P > 0.01$ ), esto probablemente se debió principalmente al rápido descenso en el pH a partir del día 0 en todos los tratamientos y al bajo contenido de proteína cruda del material al ensilar.

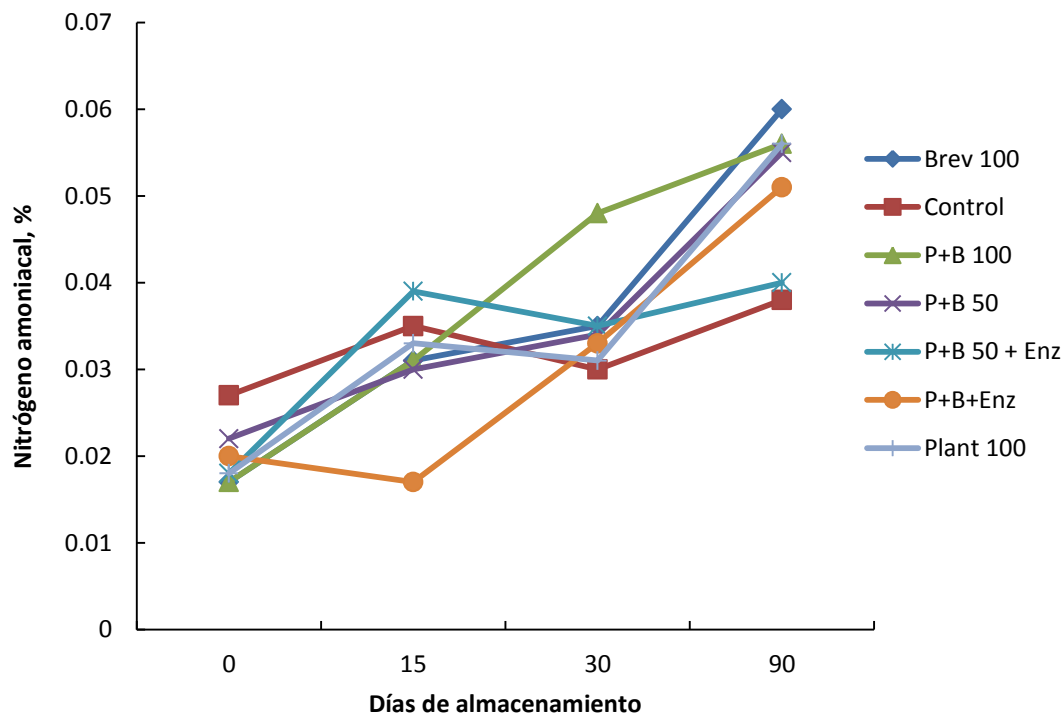
**Cuadro 5. Medias mínimas cuadráticas y error estándar de la media del porcentaje de nitrógeno amoniacal y proteína cruda de ensilaje de maíz con y sin la inclusión de inóculos microbianos<sup>1</sup>.**

Tratamiento	Tiempo (Días)	Nitrógeno amoniacal %	Proteína cruda %
Control	0	0.027 ± 0.0024	7.71 ± 0.39
	15	0.035 ± 0.0024	7.81 ± 0.39
	30	0.030 ± 0.0024	6.97 ± 0.39
	90	0.038 ± 0.0023	6.80 ± 0.37
Plant 100	0	0.018 ± 0.0024	7.07 ± 0.39
	15	0.033 ± 0.0024	7.84 ± 0.39
	30	0.031 ± 0.0024	7.17 ± 0.39
	90	0.056 ± 0.0023	7.57 ± 0.37
Brev 100	0	0.017 ± 0.0024	6.94 ± 0.39
	15	0.031 ± 0.0024	8.07 ± 0.39
	30	0.035 ± 0.0024	6.64 ± 0.39
	90	0.060 ± 0.0023	7.80 ± 0.37
P+B 100	0	0.017 ± 0.0024	7.74 ± 0.39
	15	0.031 ± 0.0024	7.21 ± 0.39
	30	0.048 ± 0.0024	8.24 ± 0.39
	90	0.056 ± 0.0023	7.47 ± 0.37
P+B+Enz	0	0.020 ± 0.0024	7.50 ± 0.39
	15	0.017 ± 0.0023	7.47 ± 0.39
	30	0.033 ± 0.0024	7.31 ± 0.39
	90	0.051 ± 0.0023	7.27 ± 0.37
P+B 50	0	0.022 ± 0.0024	6.70 ± 0.39
	15	0.030 ± 0.0024	7.24 ± 0.39
	30	0.034 ± 0.0024	7.24 ± 0.39
	90	0.055 ± 0.0023	7.93 ± 0.37
P+B 50 + Enz	0	0.018 ± 0.0024	7.47 ± 0.39
	15	0.039 ± 0.0024	6.94 ± 0.39
	30	0.035 ± 0.0024	8.21 ± 0.39
	90	0.040 ± 0.0023	6.97 ± 0.37

<sup>1</sup> Los valores representan las medias mínimas cuadradas (± error estándar).

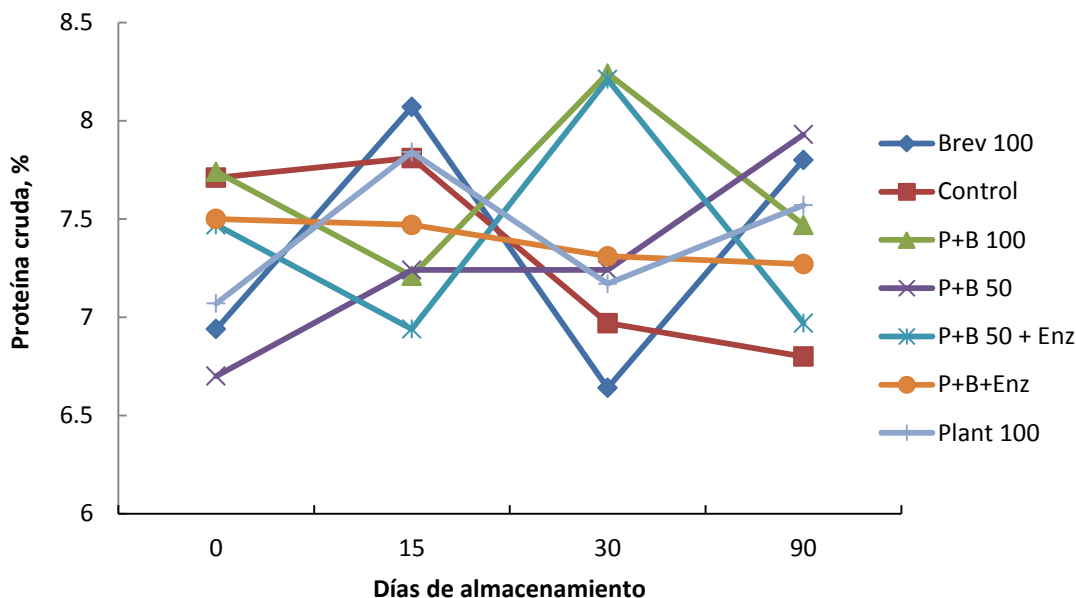
Control= Sin inóculo; Brev 100 = *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En = Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50=Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz=Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg.





**Figura 6. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el contenido de nitrógeno amoniacal de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

Por su parte, Guo *et al.* (2013), no observaron diferencias en la concentración de PC en ensilajes de zacate *Festuca* de 60 días entre el ensilaje no tratado y el tratado con inóculos a base de *Lactobacillus plantarum* y *L. buchneri*.



**Figura 7. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de proteína cruda de ensilaje de maíz.**

Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

No se detectaron ácidos grasos volátiles en ninguno de los ensilajes, lo cual pudo deberse a diversos factores, entre ellos tal vez la baja concentración de carbohidratos solubles del forraje original por la edad en que fue cortado. Los carbohidratos presentes en el maíz para ensilar deben ser fermentados por las bacterias lácticas, para lo cual la anaerobiosis es muy importante, en el caso del presente estudio, esta anaerobiosis fue buena ya que tampoco se detectó la presencia de ácido butírico, el cual es el principal producto de la fermentación de las bacterias proteolíticas como *C. bifementans* y *C. sporogenes*, cuyo substrato principal son los aminoácidos teniendo como producto de su fermentación los ácidos acético y butírico, así como aminas y amoniaco (McDonald *et al.*, 1995).

No se determinó la concentración de ácido láctico en el presente estudio, el cual en general debe de encontrarse en un porcentaje mayor al 3%. A pesar de que éste no se pudo medir, la rápida disminución de pH sugiere una buena

concentración de ácido láctico. Kung y Ranjit (2001), al adicionar un inóculo que contenía *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii* y enzimas en plantas de cebada observaron que estos inóculos aumentaron las concentraciones de ácido láctico al día 69 con respecto al grupo de plantas que no habían sido tratadas, lo cual se vio reflejado en una disminución del pH. Guo *et al.* (2013) al ensilar durante 60 días Festuca de primer corte encontraron las mayores concentraciones de ácido láctico al inocular solamente *L. plantarum* que su combinación con *L. buchneri*. Cárdenas *et al.* (2003) observaron que al adicionar leguminosas a ensilajes de pastos tropicales, hubieron mayores concentraciones de ácido láctico (4.5 y 4.9%) que en ensilajes mixtos de pasto Taiwán con diferentes especies arbóreas. Por otro lado, Queiroz *et al.* (2013) encontraron que el ensilaje control presentó las concentraciones más altas de ácido láctico (2.57%), que en el ensilaje tratado con una combinación de *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* (2.30%). Kung *et al.*, (2007), encontraron que al ensilar maíz de alta humedad inoculado con *Lactobacillus buchneri* y su combinación, se redujo el porcentaje de ácido láctico respecto al maíz no tratado (0.73% vs 0.60 y 0.52% respectivamente), pero sin ser diferentes estadísticamente ( $P>0.05$ ).

Los tratamientos con inóculos no alteraron el contenido de la fibra de los ensilajes ( $P>0.1$ ). En el Cuadro 6 se presentan las medias mínimas cuadráticas ( $\pm$ error estándar) del porcentaje de FDN y de FDA para cada tratamiento a través del tiempo de almacenaje. La media general de FDN ( $\pm$  error estándar) fue de 57.26 ( $\pm$  4.66), mientras que la de FDA fue de 30.44 ( $\pm$  3.18).

El proceso de ensilaje es una forma de preservar la calidad del material vegetativo que se ofrecerá posteriormente a los animales, por lo cual ese proceso no debe de alterar su composición original. Las paredes celulares (FDN y FDA) son uno de los principales nutrimentos para los microorganismos ruminales y su degradación debe ser a ese nivel, por lo cual debe evitarse que sean degradadas durante el ensilaje. La degradación de la fibra por parte de las bacterias celulolíticas ruminales dará como resultado la producción de ácidos grasos volátiles que posteriormente serán la principal fuente de energía para el animal.

Por lo tanto si se degradaran las paredes celulares a nivel del silo, esos ácidos grasos volátiles se perderían al momento de abrir y servir el ensilaje siendo desperdiciada esa fuente de energía que iba dirigida a los animales.

En la Figura 8, se presentan los cambios en la concentración de FDN a través de los días de almacenamiento para los tratamientos evaluados, donde se puede apreciar que en todos los tratamientos hubo variaciones sin un patrón definido, lo cual pudiera deberse a la calidad del material que se empleó. Kung *et al.* (2007), al ensilar maíz con alta humedad con un 7.92% de FDN, después de 90 días de almacenamiento el grupo control presentó el 8.36%, el grupo tratado con *L. buchneri* presentó el 8.29%, el grupo tratado con una combinación de enzimas(xilanasa,  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$  glucanasa) presentó el 8.44%, el grupo tratado con *L. buchneri* y enzimas (xilanasa,  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$  glucanasa) presentó concentraciones de 7.92%, no observando diferencias entre estos grupos tratados ( $P>0.05$ ).

Kung y Ranjint (2001) observaron que al ensilar cebada durante 69 días, el grupo control presentó porcentajes del 68.5% de FDN, mientras que el grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 100,000 UFC/g adicionado de enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) presentó porcentajes de FDN de 67.2%, el grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 500,000 UFC/g adicionado de enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) presentó el 67.9% de FDN, el grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 1000,000 UFC/g adicionado de enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) presentó el 67.6% de FDN, el grupo tratado con una combinación de microorganismos (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propinebacterium freudenreichii*) y enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) presentaron el 63.4% de FDN, y el grupo tratado con un Buffer propiónico ácido base el porcentaje de FDN fue de 65.3%. De estos valores el grupo control fue similar ( $P>0.05$ ) al grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 500,000 UFC/g adicionado de enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) y al grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 1000,000 UFC/g adicionado de enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) y

diferente ( $P < 0.05$ ) al resto de tratamientos. El grupo tratado con el buffer propiónico ácido base fue diferente ( $P < 0.05$ ) al resto de tratamientos.

**Cuadro 6. Medias mínimas cuadráticas y error estándar de la media del porcentaje de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de ensilajes de maíz con y sin la inclusión de inóculos microbianos<sup>1</sup>.**

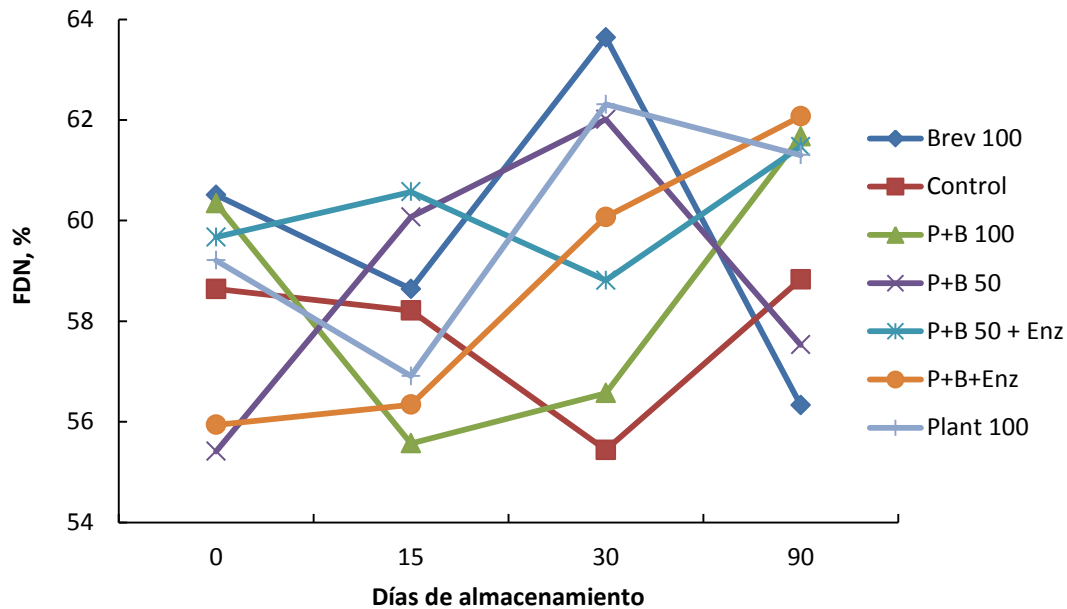
Tratamiento (Inóculo)*	Tiempo (Días)	FDN %	FDA %
Control	0	58.64 ± 2.88	27.26 ± 1.96
	15	58.21 ± 2.88	29.93 ± 1.96
	30	55.44 ± 2.88	29.23 ± 1.96
	90	58.83 ± 2.77	29.87 ± 1.89
Plant 100	0	59.21 ± 2.88	29.36 ± 1.96
	15	56.91 ± 2.88	29.73 ± 1.96
	30	62.31 ± 2.88	34.66 ± 1.96
	90	61.30 ± 2.77	35.07 ± 1.89
Brev 100	0	60.51 ± 2.88	35.90 ± 1.96
	15	58.64 ± 2.88	28.86 ± 1.96
	30	63.64 ± 2.88	32.56 ± 1.96
	90	56.33 ± 2.77	30.57 ± 1.89
P+B 100	0	60.34 ± 2.88	29.40 ± 1.96
	15	55.57 ± 2.88	30.66 ± 1.96
	30	56.57 ± 2.88	28.53 ± 1.96
	90	61.67 ± 2.77	31.57 ± 1.89
P+B+Enz	0	55.94 ± 2.88	23.76 ± 1.96
	15	56.34 ± 2.88	30.40 ± 1.96
	30	60.07 ± 2.88	33.73 ± 1.96
	90	62.07 ± 2.77	31.20 ± 1.89
P+B 50	0	55.41 ± 2.88	23.16 ± 1.96
	15	60.07 ± 2.88	33.40 ± 1.96
	30	62.01 ± 2.88	40.00 ± 1.96
	90	57.53 ± 2.77	29.70 ± 1.89
P+B 50 + Enz	0	59.67 ± 2.88	29.23 ± 1.96
	15	60.57 ± 2.88	32.36 ± 1.96
	30	58.81 ± 2.88	31.26 ± 1.96
	90	61.47 ± 2.77	33.17 ± 1.89

<sup>1</sup> Los valores representan las medias mínimas cuadradas (± error estándar). Control= Sin inóculo; Brev 100 = *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En = Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50=Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz=Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg.

El grupo tratado con una combinación de microorganismos (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propinebacterium freudenreichii*) y enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) de igual forma fue diferente al resto de tratamientos ( $P < 0.05$ ); los tres grupos tratados con *L. buchneri* fueron iguales entre sí ( $P < 0.05$ ).

Queiroz *et al.* (2013) observaron que los porcentajes de FDN del ensilaje de forraje fresco de maíz, inoculado con agua presentó 41.20%, el grupo tratado con *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus buchneri* presentó 42.20%, el grupo tratado con benzoato de sodio presentó 41.20%, el grupo tratado con una combinación de ácido propiónico, benzoico, láctico y sórbico presentó el 43.70%, el grupo tratado con *Acetobacter pasteurianus* presentó el 44.00%, el grupo tratado con *Gluconobacter oxydans* presentó el 44.40%, el grupo tratado con *L. plantarum* (utilizando un producto comercial Ecosly 200T) presentó el 44.90%, el grupo tratado con una combinación de *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* presentó el 44.60% mientras que el grupo tratado con *L. plantarum* (con un producto comercial Biomax 5) presentó el 45.70%, donde el benzoato de sodio fue similar al grupo control y al grupo tratado con *Pediococcus pentosaceus* y *L. buchneri* ( $P > 0.05$ ) pero diferente al resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ). El grupo tratado con la mezcla de ácidos propiónico, benzoico, láctico y sórbico fue similar al grupo control y al grupo tratado con *Pediococcus pentosaceus* y *L. buchneri* ( $P > 0.05$ ) pero diferente al resto de tratamientos ( $P < 0.05$ ). Los grupos tratados con *Pediococcus pentosaceus* y *L. buchneri* son iguales ( $P > 0.05$ ) a los grupos tratados con la combinación de ácidos propiónico, benzoico, láctico y sórbico así con el grupo tratado con *Acetobacter pasteurianus* al grupo tratado con *Gluconobacter oxydans* y al grupo tratado con *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium*. Por último, los grupos tratados con la combinación de ácidos propiónico, benzoico, láctico y sórbico; el grupo tratado con *Acetobacter pasteurianus*, al grupo tratado con *Gluconobacter oxydans*, el grupo tratado con *L. plantarum* (de la marca Ecosly 200T), el grupo tratado con la combinación de *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y

*Enterococcus faecium* y finalmente el grupo tratado con *L. plantarum* (de la marca Biomax 5) fueron iguales ( $P>0.05$ ) entre sí.

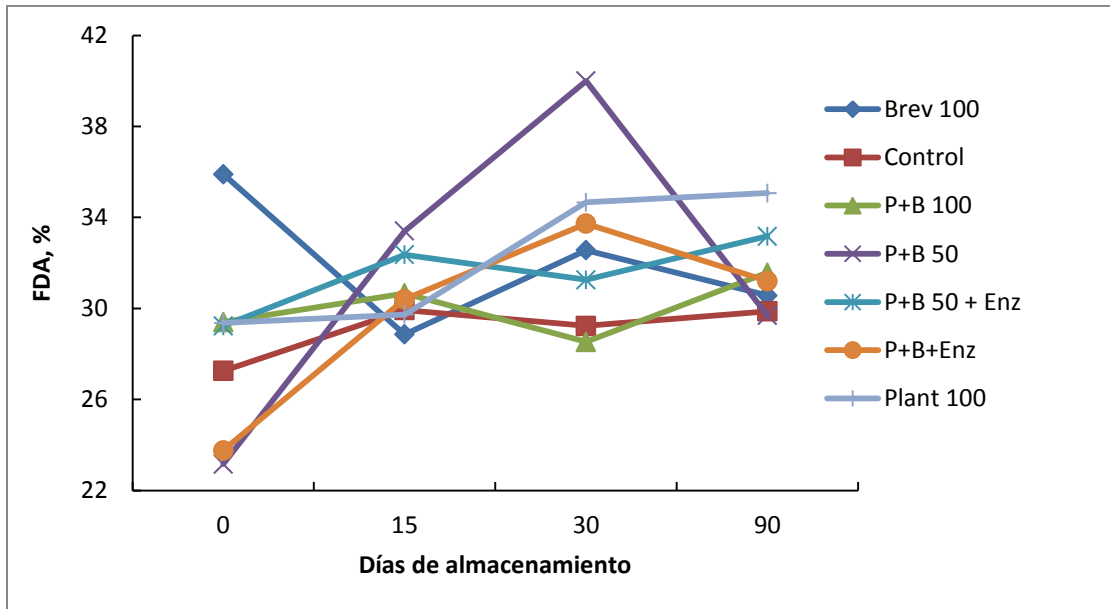


**Figura 8. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de fibra detergente neutro de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L.brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

En la Figura 9 se puede apreciar la variación en la concentración de FDA en los ensilajes a través de los diferentes tiempos evaluados, pero sin ser diferentes entre tratamientos ( $P>0.1$ ), con una media general ( $\pm$  error estándar) de 30.44 ( $\pm$  3.18). Kung y Ranjit (2001) encontraron una disminución de la concentración de FDA en ensilaje de cebada a los 69 días almacenaje en aquellos silos que recibieron diversos inóculos con relación al ensilaje control presentando valores de FDA de 43.1% para el grupo control, 42.3% para el grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje adicionado con enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasas y galactomanasa), 42.9% para el grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 500,000 UFC/g de forraje adicionado con enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -

amilasa, xilanasa y galactomanasa), 42.6% para el grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 1000,000 UFC/g de forraje, 41.1% para el grupo tratado con *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propinebacterium freudenreichii* y enzimas ( $\beta$  glucanasa,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa y galactomanasa) y de 41.7 para el grupo tratado con un buffer propiónico ácido base, donde el grupo tratado con *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propinebacterium freudenreichii* fue similar ( $P>0.05$ ) al grupo tratado con el buffer propiónico ácido base, pero diferente al resto de tratamientos ( $P<0.05$ ), asimismo el tratamiento buffer propiónico es similar ( $P>0.05$ ) al grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 1000,000 UFC/g adicionado con enzimas y al grupo tratado con *L. buchneri* a una dosis de 100,000 UFC/g adicionado con enzimas; los grupos control, *L. buchneri* a una dosis de 100,000 UFC/g adicionado con enzimas, *L. buchneri* a una dosis de 500,000 UFC/g adicionado con enzimas y el grupo de *L. buchneri* a una dosis de 1000,000 UFC/g adicionado con enzimas no presentaron diferencias entre sí ( $P>0.05$ ), lo cual puede deberse a las enzimas sacarolíticas del aditivo y al perfil bacteriano del aditivo *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Propinebacterium freudenreichii*. Sin embargo, Kung *et al.* (2007) no encontraron diferencias en ensilajes de maíz recibiendo diversos tipos de ensilajes microbianos ni enzimas (xilanasa,  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$  glucanasa). Queiroz *et al.* (2013) tampoco encontraron diferencias ( $P>0.05$ ) en el contenido de FDA de ensilaje de maíz inoculado con diversos tipos de aditivos microbianos, donde después de 120 días de almacenaje el grupo control tratado únicamente con agua presentó el 23.10% de FDA, el grupo tratado con *Pediococcus pentosaceus* y *L. buchneri* presentó el 24.20%, el grupo tratado con benzoato de sodio presentó el 24.50%, el grupo tratado con una mezcla de ácidos (propiónico, benzoico, láctico y sórbico) presentó el 25.00%, el grupo tratado con *Acetobacter pasteurianus* presentó el 25.30%, el grupo tratado con *Gluconobacter oxydans* presentó el 25.50%, el grupo tratado con *L. plantarum* de la marca Ecosly 200T presentó el 25.60%, el grupo tratado con una combinación de *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* presentó el 25.80% y el grupo tratado con *L. plantarum* de la marca Biomax5 presentó el 25.30%.





**Figura 9. Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento en el porcentaje de fibra detergente ácido de ensilaje de maíz.** Control=Sin inóculo; Brev 100= *Lactobacillus brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; Plant 100= *L. plantarum* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 100= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco; P+B+En =Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg; P+B 50= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco; P+B 50 + Enz= Combinación de *L. plantarum* y *L. brevis* a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana 1640 Unidades/kg. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.1$ ).

Guo *et al.* (2013) al ensilar zacate Festuca al primer corte después de 60 días de almacenamiento, observaron que el ensilaje tratado con una combinación de *Lactobacillus plantarum* y *L. buchneri* presentaba niveles de FDN mientras que al inocularlo solamente con *Lactobacillus plantarum* éste presentaba niveles de FDN igual al del ensilaje control 46.6%, siendo estos dos últimos iguales entre sí ( $P>0.05$ ) y diferentes del grupo tratado con la combinación de bacterias ( $P<0.05$ ). Al ensilar Festuca de segundo corte (fase vegetativa, cuando la planta media de 30 a 35cm), observaron que el ensilaje control presentaba niveles de FDN de 57.9%, el cual fue similar ( $P>0.05$ ) al 58.2% del ensilaje tratado con la combinación de *L. plantarum* con *L. buchneri*.

Otros autores tampoco han encontrado diferencias en las fracciones de fibra de diversos ensilajes al incluir inóculos bacterianos como *L. buchneri*, *L.*

plantarum, *Pediococcus petosaceus*, *Propinibacterium freaudenreichii* y enzimas (Kung *et al.*, 2007; Kung y Ranjit 2001).

Aunque la adición de bacterias homolácticas, ha mejorado la estabilidad aeróbica del maíz con alta humedad en algunos estudios, esto no siempre es efectivo, debido probablemente a que el pH y el ácido láctico no frenan eficazmente el crecimiento de las levaduras (Kung *et al.*, 2007).

Bajo las condiciones del presente estudio, no pudo observarse diferencias por efecto del tratamiento en las diferentes variables analizadas, algunos autores establecen que no es necesario inocular el material ensilado con cultivos productores de ácido láctico, ya que esto no mejora la calidad del ensilaje (Moore, 1985). En el caso del presente estudio, al ensilar maíz con porcentajes de materia seca por encima del 40%, el adicionar bacterias lácticas y enzimas no afecta la calidad química del ensilaje si este al momento de ensilar mantiene buenas condiciones de anaerobiosis que permitan una rápida fermentación con una disminución del pH. Sin embargo, el porcentaje elevado de materia seca con el cual se ensiló, sugieren que posiblemente un elevado número de carbohidratos solubles se hayan lignificado haciéndose imposibles de fermentar por parte de los microorganismos.

## CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones del presente estudio, la inoculación de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* a distintas dosis, combinados con una enzima microbiana y combinados entre sí a distintas dosis, no generó cambios significativos sobre la calidad química y la capacidad fermentativa del ensilaje de maíz empleado en el presente estudio. El procedimiento de ensilaje empleado logró conservar las características químicas del material empleado. Probablemente el alto porcentaje de materia seca del forraje sugiere un bajo contenido de carbohidratos solubles para que los aprovecharan los microorganismos inoculados, por lo que sería importante evaluar estos inóculos en otro forraje con mayor contenido de humedad, de carbohidratos solubles y de nitrógeno, donde se pudiera apreciar el beneficio del empleo de este tipo de aditivos.

## LITERATURA CITADA

- Addah, W., J. Baah, P. Groenewegen, E. K. Okine, T. A. McAllister. 2010. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant; *Can J. Anim. Sci.* 91: 133-146.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA. 1990.
- Bolsen, K. K., M. A. Young, M. K. Siefers, G. L. Huck. 1995. Improving silage Quality. *Dairy Day*. Consultado el 28 de Abril del 2014. Disponible en: <http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/handle/2097/8793/DairyDay1995pg29-31.pdf?sequence=1>.
- Bossio, D. Silo Bolsa: Tecnología clave en la logística de comercialización y el transporte de granos. Universidad Tecnológica Nacional. Centro Tecnológico de Transporte, Tránsito y Seguridad Vial. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Consultado el 12 de enero de 2014. Disponible en: [http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=13&ved=0CG4QFjAM&url=http%3A%2F%2Fwww.utn.edu.ar%2Fdownload.aspx%3FidFile%3D20613&ei=EF\\_TUoHTO9HkoATLk4GwCQ&usq=AFQjCNG\\_0hxcsmkCYdaZzWVTLbz bqOYteQ&bvm=bv.59026428,d.cGU](http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=13&ved=0CG4QFjAM&url=http%3A%2F%2Fwww.utn.edu.ar%2Fdownload.aspx%3FidFile%3D20613&ei=EF_TUoHTO9HkoATLk4GwCQ&usq=AFQjCNG_0hxcsmkCYdaZzWVTLbz bqOYteQ&bvm=bv.59026428,d.cGU)
- Cárdenas, M. J. V., C. A. Sandoval, S. F. J. Solorio. 2003. Composición Química de ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas de Yucatán México; *Técnica Pecuaria México*; 41: 283-294.
- Cullison, E. A. 1983. Alimentos y alimentación de animales, Editorial Diana S.A., 1<sup>a</sup> Edición, México D.F., pp. 236-253.
- De la Roza, D. B. 2005. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad; IV Jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín (Pontevedra); Consultado el 03 de mayo de 2014; Disponible en: [http://www.mouriscade.com/doc\\_ponencias/oct-2005/ensilado\\_zonas\\_humedas\\_e\\_indicadores\\_calidad.pdf](http://www.mouriscade.com/doc_ponencias/oct-2005/ensilado_zonas_humedas_e_indicadores_calidad.pdf).
- Guo, X. S., D.J. Undersander, D. K. Combs. 2013. Effect of *Lactobacillus* inoculants and forage dry matter on the fermentation and aerobic stability of ensiled mixed- crop tall fescue and meadow fescue; *American Dairy Science Association*; *J. Dairy Sci.* 96:1735- 1744.
- Intervet. 2006. Alimentación del ganado; En: Recomendaciones para el manejo del corral de engorda; Intervet México S.A. de C. V., México; pp. 48-49.
- Jalč, D., A. Lauková, M. Pogány Simonová, Z. Váradyová, P. Homolka. 2009. Bacterial Inoculant Effects on Corn Silage Fermentation and Nutrient Composition; *Asian- Aust. J. Anim. Sci.* 7: 977-983.

- Koc, F., L. Coskuntuna, M. L. Ozduven. 2008. The Effect of Bacteria + Enzyme Mixture Silage Inoculant on The Fermentation Characteristic, Cell Wall Contents and Aerobic Stabilities of Maize Silage; Pakistan Journal of Nutrition; 7 (2): 222-226.
- Kung Jr., L. and N.K. Ranjit. 2001. The Effect of *Lactobacillus buchneri* and Other Additives on the Fermentation and Aerobic Stability of Barley Silage; J. Dairy Sci. 84: 1149-1155.
- Kung Jr., L., J.R. Schmidt, E. T. Ebling, W. Hu. 2007. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground an Whole high- Moisture Corn; J. Dairy Sci. 90: 2309-2314.
- Kung Jr., L. 2010. Aerobic stability of silage. In The 2010 California Alfalfa and Forage Symposium, Visalia, California.
- Llamas, L. G. 1986. Fuentes de Forraje., En: *Engorda de Ganado Bovino en corrales*. A.S. Shimada, F.G. Rodríguez, J. A. I. Cuarón (eds), Editorial Consultores en Producción Animal, S. C. México, pp. 67-68
- McDonald, P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 1999. Nutrición Animal. 5ª Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España., pp. 425- 437, 471- 472.
- Moore, L. A. 1985. Ensilados de Gramíneas y Leguminosas. En: Forrajes; Hughes H. D., Heat E. M., Metcalfe D., Editorial Continental S.A. de C.V., México., Décima segunda impresión., pp. 579- 591.
- Nkosi, B.D., R. Meeske, T. Langa, R.S. Thomas. 2011. Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams; South African Journal of Animal Science. 41: 350- 359.
- Nkosi, B.D., P.V Vadhani, K. Brijwani, A. Nanjunda, R. Meeske. 2012. Effects of bacterial inoculants and an enzyme on the fermentation quality and aerobic stability of ensiled whole- crop sweet sorghum; South African Journal of Animal Science. 42: 232- 240.
- Ozduven, L. M., O. Z. Kursun, F. Koc. 2010. The Effects of Bacterial Inoculants and/or Enzymes on the Fermentation, Aerobic Stability and *in vitro* Dry and Organic Matter Digestibility Characteristics of Triticale Silages; Kafkas Univ Vet Fak Derg; 16: 751-756.
- Queiroz, O. C. M., K. G. Arriola, J. L. P. Daniel, A. T. Adesogan. 2013. Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage; J. Dairy Sci. 96: 5836-5843.
- Reich, J. L. and L. Kung Jr. 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage; Animal Feed Science and Technology 159: 105-109.
- Robertson, J. B. and P. J. Van Soest. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. En: The analysis of dietary fiber in food. W.T. James O. Theander, eds. Markel Dekker, Inc. N.Y. pp. 123-158.

- Roberts, S. A., H. Xin, B. J. Kerr, J. R. Rusell, K. Bregendahl. 2007. Effects of Dietary Fiber and Reduced Crude Protein on Ammonia Emission from Laying-Hen Manure. Agricultural Research Service, USDA, Ames, IA 50011, Poultry Science 86: 1625-1632.
- Shimada, S. A. 1986. Henificación y Ensilado. En: Engorda de Ganado Bovino en corrales. A.S. Shimada, F.G. Rodriguez, J. A. I. Cuarón (eds), Editorial Consultores en Producción Animal, S. C. *México*, pp. 76- 112.
- Shimada, S. A. M. 1990. Técnicas para evaluar forrajes conservados en forma ensilada. En: Manual de Técnicas de Investigación en Ruminología; Castellanos R. A., Llamas L. G., Shimada S. A. (Eds); Editorial Consultores en Producción Animal S. C., Primera Edición; México D.F.
- Sprague, M. A. 1985. Los cereales como forrajes. En: Forrajes; Hughes H. D., Heat E. M., Metcalfe D., Editorial Continental S.A. de C.V., México., Décima segunda impresión., pp. 381.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Rumen. 2° Edition. Cornell University Press. Ithaca, N. Y.



# **“Cambios en la composición química del ensilaje de maíz tratado con diferentes tipos de inóculos microbianos.”**

**Rodrigo Núñez Piña**

Sinodales:

Dra. María Guadalupe Bernal Santos.

M. en C. Konisgmar Escobar García.

M. en C. Araceli Aguilera Barreyro.

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez.

# Dedicatoria

A mi familia por todo su apoyo incondicional y porque a pesar de todo siempre estamos juntos:

- Susana Piña Rico.
- Ma. Guadalupe Núñez Piña.
- Ma. Del Carmen Núñez Piña.
- Rosa Ma. Núñez Piña.
- Guadalupe Jimena Loarca Calderón
- Familia Núñez Perusquía.

Y a los que ya no están con nosotros, pero siguen siendo una parte vital en mi vida:


- Ramón Núñez Piña.
- Teresa Piña Rico.
- Sergio Núñez Olguín.
- David Loarca Piña.
- Salvador Zamorano Acosta.



**Proyecto patrocinado por la empresa  
SAFMEX, S.A. DE C.V.**

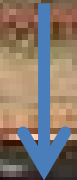
A handwritten signature in green ink, appearing to be 'SAFMEX', located at the bottom center of the page.

# Introducción

- Importancia de la alimentación dentro de las unidades productivas.
- Estrategias que optimicen la producción animal.
-  insumos utilizados para la alimentación del ganado
- Escasez en la disponibilidad de insumos en ciertas épocas del año



**Suministrar todo el año**



**Forraje**



**Cumplir requerimientos**



**Fibra**



**Correcto funcionamiento  
ruminal**



# Forraje

## Fresco



Cosechando los cultivos forrajeros en un estado más succulento



## Conservado

### Henificado



↓ Contenido de agua de la planta hasta que contenga alrededor de 15% de humedad

La planta puede perder nutrimentos o bajar su palatabilidad, en ocasiones se hace difícil por las condiciones climáticas donde se produce.

### Ensilado



Fermentación ácido láctica por bacterias de los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, etc.

Excelente proporción de vitaminas, alto contenido de humedad, rico en ácidos orgánicos (AGV's) y alta palatabilidad.

## **Necesidad conservar**

- Estacionalidad de cultivos
- Variación en la calidad de los forrajes
- En el caso del trópico, las gramíneas tropicales presentan un mayor valor nutritivo en épocas lluviosas





# ENSILADO

Método de conservación de forrajes húmedos

Fermentación natural bajo condiciones de anaerobiosis

Bacterias ácido lácticas

Carbohidratos solubles

- Ácidos orgánicos (láctico, acético y butírico)
- Etanol
- Gases de la fermentación ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{NO}_2$ )
- Agua
- Calor

Preservar el forraje con la mínima pérdida de nutrientes

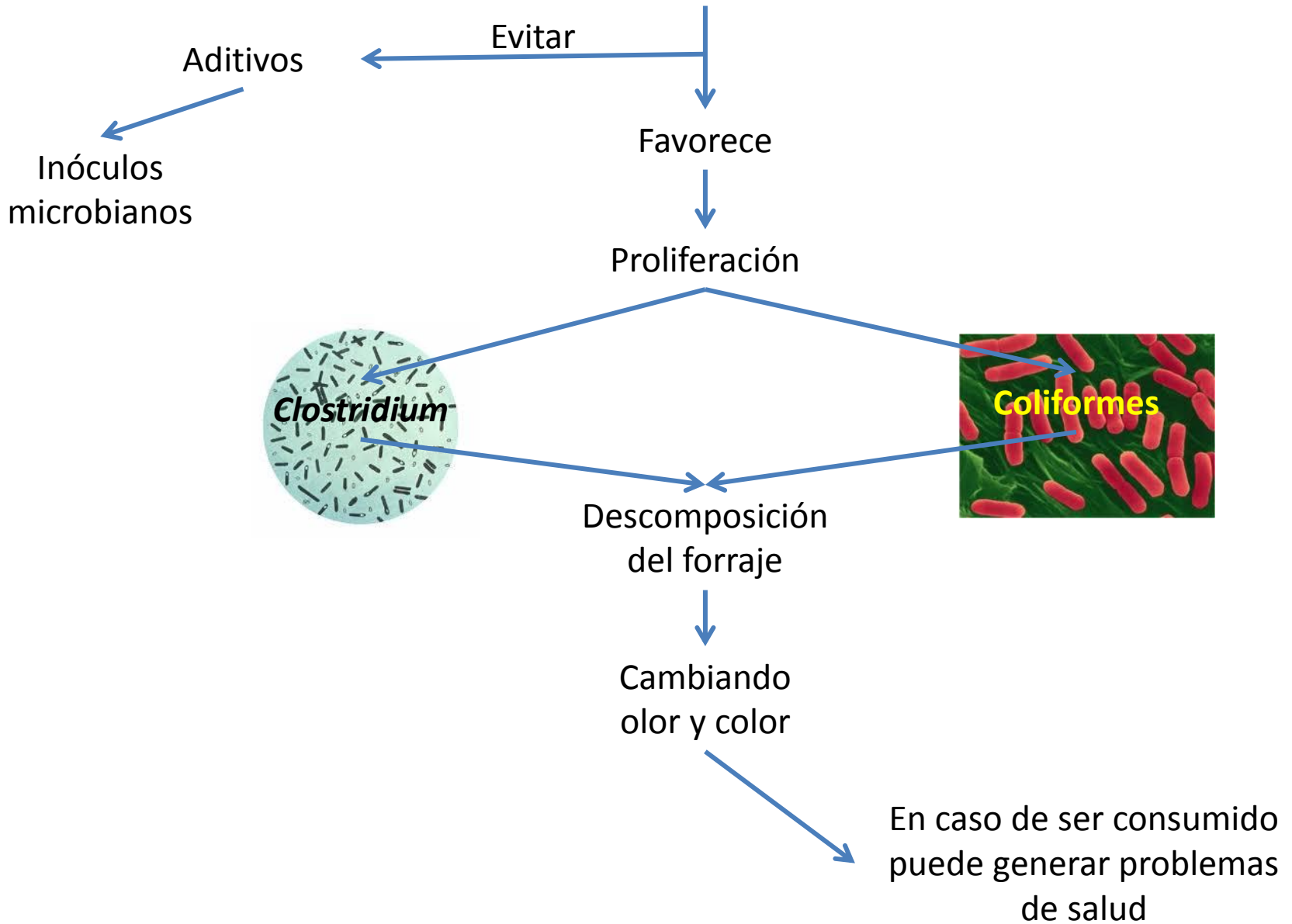
Forrajes mantienen la misma concentración de ácidos grasos de cadena larga de cuando fueron cosechados

pH

Preservación del forraje



# Mal Ensilaje



# ***Factores que afectan la calidad del ensilaje***

Condiciones climatológicas durante la cosecha

Tipo de cultivo

Entrenamiento del personal

Estado de madurez

Uso de aditivos efectivos

Momento adecuado del corte

Tipo de silo

Calidad y  
valor  
nutricional  
del ensilaje

Tipo y número de microorganismos  
dominantes durante el proceso de  
fermentación

Velocidad de llenado

Materia seca

Densidad del forraje después de haberse  
empacado

Concentración de carbohidratos solubles

Técnica de sellado

Capacidad buffer del forraje





## Características del Forraje al ensilar

- % humedad - 66 a 72% (34-28%MS)
  - Mucha agua = pudrición, escurrimiento
  - Poca agua = dificultad compactación
- Contenido de glúcidos solubles - 6 al 8% en relación a la materia seca
- Mínima capacidad amortiguadora
- Población elevada de lactobacilos
- Compactación y temperatura ideal que permita una rápida reproducción microbiana



# REACCIONES QUÍMICAS OCURRIDAS DURANTE EL PROCESO DE ENSILADO.

Después del corte y primeras fases del ensilado

Reacciones de respiración y proteólisis — Debido enzimas de las plantas  
CO<sub>2</sub> y agua

Agota el oxígeno de la masa de ensilaje { Bacterias aerobias del forraje  
Bacterias facultativas  
Respiración propia de la planta

Fermentación

Primeras horas del ensilado se produce fermentación acética (antimicótico)

Fermentación Láctica



**Respiración** → Degradación oxidativa → Compuestos orgánicos → Obtener energía

Principal fuente respiratoria

Carbohidratos

Oxidación de la glucosa

Glucólisis y ciclo de Krebs → CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O

Plantas recién cortadas → Presencia de oxígeno

Energía de la glucosa → Calor

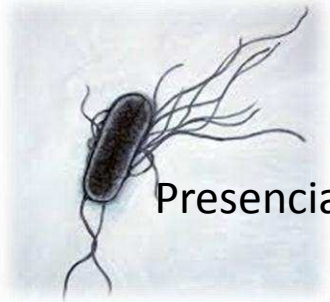
Produce ambiente favorable para las bacterias anaeróbicas



## Fases iniciales de ensilaje

Fermentación acética

Disminuye la cantidad de materia seca y compuestos del ensilaje la concentración de carbohidratos solubles utilizados para el proceso fermentativo

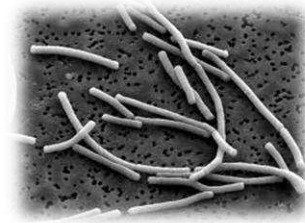


Presencia de enterobacterias

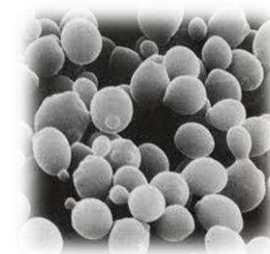
18-25°C

Anaerobiosis y acidez

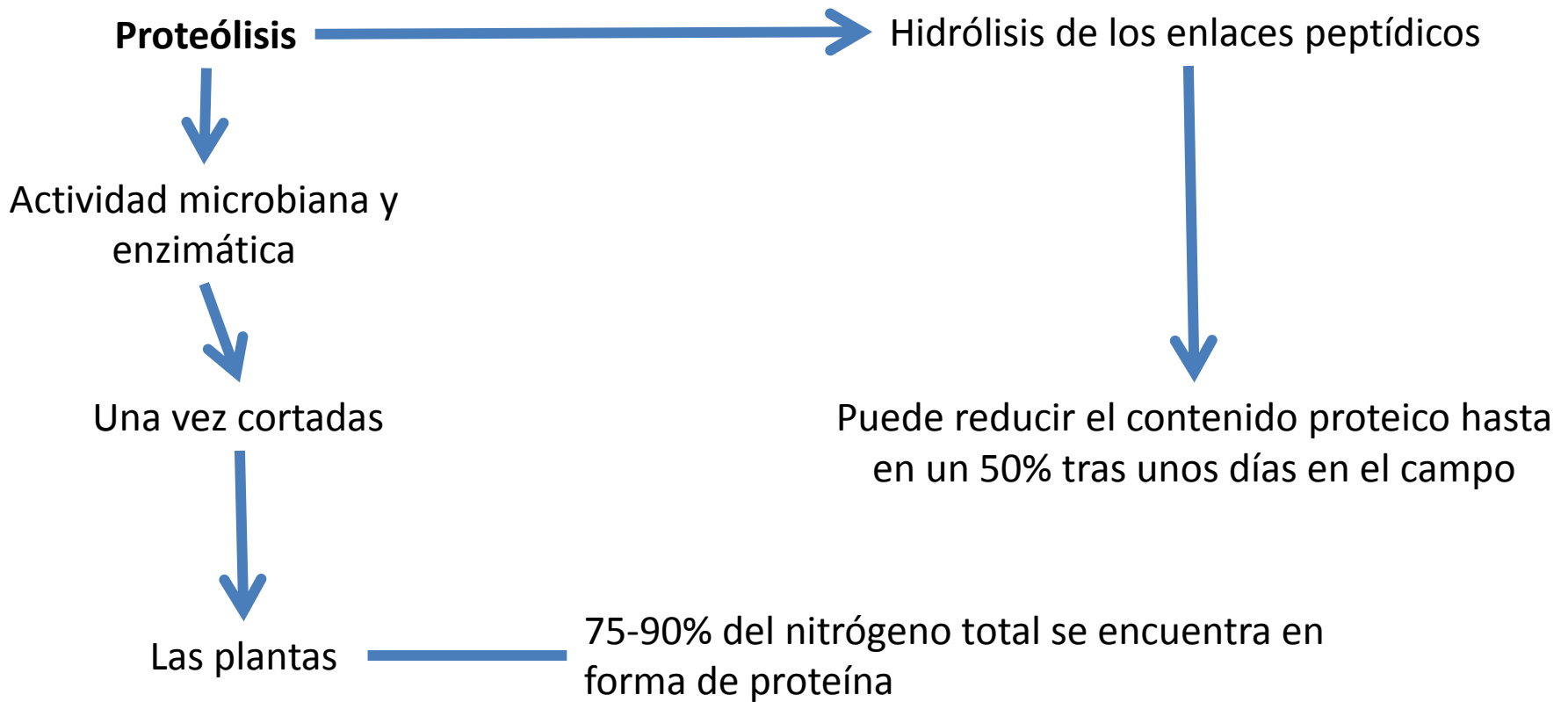
Bacterias lácticas



Utilizadas como sustrato para crecimiento



Levaduras



Una vez ensilado el material, la proteólisis continúa aunque dicha actividad se reduce conforme desciende el pH



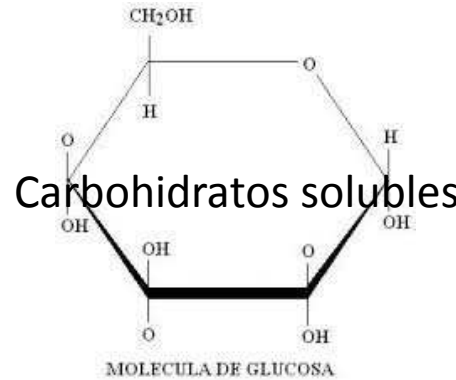
Anaerobiosis → 4 - 5 horas

Fermentación

Bacterias ácido lácticas

Metabolismo bacteriano

Preservación del material forrajero de forma indefinida



Carbohidratos solubles

Ácido láctico



Ácidos orgánicos  
Gases Etanol  
Agua  
Calor

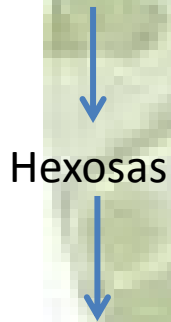
F. Homoláctica  
F. Heteroláctica

# Bacterias ácido lácticas

2 Vías metabólicas

## Fermentación homoláctica

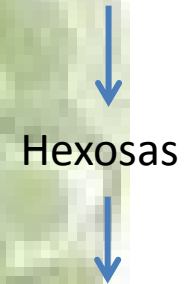
*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecalis*.



2 moléculas de ácido láctico

## Fermentación heteroláctica

*Lactobacillus brevis* y  
*Leuconostoc mesenteroides*



Ácido láctico,  
etanol y bióxido de carbono

**Contaminación del silo**

Aire o agua

Desarrollo de  
microorganismos

Ácido láctico y azúcares

Ácido butírico

Proteínas

Amoniaco



- Calentando el material
- pH
- Proliferación de hongos (levaduras) y bacterias oportunistas



# MICROORGANISMOS QUE ACTÚAN DURANTE EL PROCESO DE ENSILAJE

- En las plantas, los microorganismos más abundantes son tanto hongos como bacterias de tipo aerobias.
- Anaerobiosis en el silo: Bacterias anaerobias (ácido lácticas, clostridios y enterobacterias).



# PÉRDIDA DE NUTRIENTES DURANTE EL ENSILADO.

- Pérdidas en el campo.
- Pérdida por oxidación.
- Pérdidas por fermentación.
- Pérdidas de líquidos.



# ADITIVOS

- Permiten manipular la fermentación para mejorarla o estabilizarla.
- Usados para prevenir o reducir el crecimiento de microorganismos indeseables.



# Tipos de aditivos

1. Estimulantes de la fermentación: los inóculos bacterianos y enzimas.
2. Inhibidores de la fermentación: los ácidos propiónico, fórmico y sulfúrico.
3. Sustrato o fuentes de nutrientes: las melazas, urea y amoniaco anhidro.



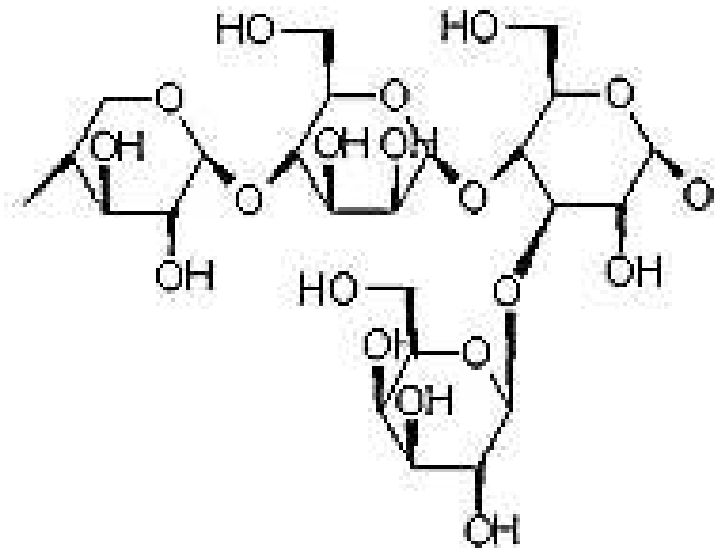
# ***Microorganismos como aditivos***

- Promueven una fermentación más rápida y eficiente incrementando la concentración de ácido láctico.
- Dosis de 100,000 a 1'000,000 UFC/g de cultivo.
- Se han usado bacterias que producen compuestos específicos con actividad antifúngica durante el ensilado: *Propionibacteria acidilactici* (no resiste bien las condiciones de acidosis, y crecimiento lento).
- Seguridad y facilidad en el manejo, no hay residuos o problemas ambientales, bajos costos, se utilizan dosis bajas, no corroen las maquinarias, y son considerados productos naturales.



## *Enzimas como aditivos*

- Celulasas y hemicelulasas: Degradan las paredes celulares, liberando los azúcares para ser fermentados por las bacterias ácido lácticas
- Estas enzimas son más efectivas si se añaden a forrajes jóvenes ensilados con un bajo contenido de materia seca



# OBJETIVO

- Evaluar el efecto de la adición de dos agentes microbianos (*Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*) a diferentes dosis, así como combinados entre ellos y adicionados con una enzima microbiana, sobre la composición química del ensilaje de maíz a diferentes tiempos de almacenamiento.



# HIPÓTESIS

- La inclusión de inóculos microbianos y enzimas microbianas en el proceso de ensilaje de maíz tiene un efecto estabilizador de la composición química del material ensilado.





# JUSTIFICACIÓN

- Escasez de forrajes en diferentes épocas del año, obliga a conservarlos.
- La conservación puede hacerse mediante el ensilaje.
- El ensilaje se puede mejorar con el uso de aditivos.
- Una alternativa accesible son los inóculos microbianos o sus enzimas.



# METODOLOGÍA

- Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Juriquilla, Qro.
- El forraje de maíz, variedad criollo, de ciclo intermedio con una edad al momento del corte de 55 días fue proporcionado por el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal INIFAP, Ajuchitlán, Qro.



# TRATAMIENTOS:

- Se evaluaron 28 tratamientos conforme a un diseño por bloques al azar, con un arreglo factorial 7 x 4, siendo los factores:
  - 7 tratamientos (dos diferentes inóculos, *L. plantarum* y *L. brevis*, en dos concentraciones cada uno y sus combinaciones, más la combinación de ambos inóculos con y sin enzima) Cuadro 1
  - 4 tiempos de conservación: 0, 15, 30 y 90 días.
- El bloque se definió por el día del ensilaje.
- El proceso de ensilado se hizo en dos días consecutivos (dos bloques), conservándose el material fresco en refrigeración hasta el momento del ensilaje.
- Cada tratamiento se realizó por triplicado.



# Cuadro 1. Descripción de los tratamientos experimentales.

\*Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. 4 tiempos de almacenaje (0, 15, 30, 90 días).

Tratamiento (Inóculo)*	Descripción
Control	Sin Inóculo
Brev 100	<i>Lactobacillus brevis</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco
Plant 100	<i>L. plantarum</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco
P+B 100	Combinación <i>L. plantarum</i> y <i>L. brevis</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco
P+B+Enz	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>L. brevis</i> a una dosis de 100,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana (ENZ, 1640 Unidades/kg)
P+B 50	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>L. brevis</i> a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco
P+B 50 + Enz	Combinación de <i>L. plantarum</i> y <i>L. brevis</i> a una dosis de 50,000 UFC/g de forraje fresco adicionados con una enzima microbiana (ENZ, 1640 Unidades/kg)

# PROCESO DE ENSILADO:

- El maíz picado fue ensilado en microsilos de laboratorio de PVC hidráulico (10 cm de diámetro x 30 cm de alto) provistos con una tapadera de hule industrial grueso conteniendo una válvula Bunsen y conservados a 23°C.



# Preparación de los inóculos y su aplicación

160 mg de cada inóculo disueltos en 30 ml de agua desionizada y rociados sobre 1.5 kg forraje fresco picado

Mezclado y empaquetado en cada microsilo

Se comprimieron utilizando una máquina compactadora diseñada por la Facultad de Ingeniería de la UAQ.

Cada microsilo se cerró herméticamente y se le inyectó  $\text{CO}_2$  a través de la válvula Bunsen.





# ANÁLISIS DE LABORATORIO:



Al tiempo correspondiente de ensilado, cada microsilo:

- Se pesó y se abrió.
- Se desecharon 2 cm de la superficie.
- Se tomaron muestras para determinación de pH.





- Una muestra se molió en un molino Wiley con criba de 2mm utilizando hielo seco; se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para determinar:
  - materia seca por arrastre con tolueno (MStol)
  - nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) (AOAC, 1990)
  - AGV's por cromatografía de gases (Roberts *et al.*, 2007)
- Otra muestra, se secó en estufa a  $55^{\circ}\text{C}$  (MS55), se molió con criba de 2mm, para determinar:
  - materia seca por estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  (MS100)
  - proteína cruda (PC) (AOAC, 1990)
  - Fracciones de fibra (Robertson and Van Soest, 1981).





# ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- Se usó un diseño por bloques al azar con un arreglo factorial 7 x 4 (TRT x Tiempo).
- El bloque se definió por el día del ensilaje.
- El modelo matemático empleado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \beta_k + \alpha\beta_{jk} + e_{ijk},$$

$Y_{ijk}$  = Son las variables de respuesta

$\mu$  = Es la media general

$\tau_i$  = Es el factor del i-ésimo bloque

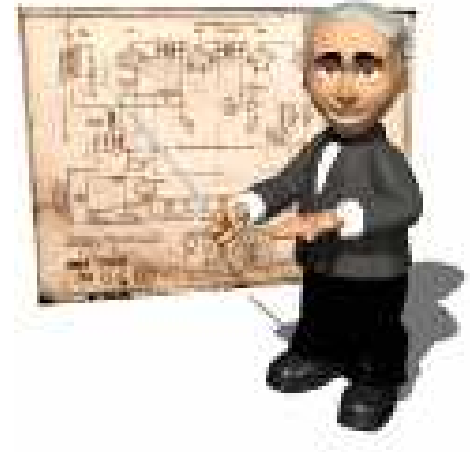
$\alpha_j$  = Es el efecto del j-ésimo nivel del factor A

$\beta_k$  = Es el efecto del k-ésimo nivel del factor B

$\alpha\beta_{jk}$  = Es la interacción del j-ésimo nivel del factor A con el k-ésimo nivel del factor B

$e_{ijk}$  = Es el error aleatorio

- Las variables de respuesta evaluadas fueron MS 55°C, MS100°C, MStol, pH, N-NH<sub>3</sub>, PC, FDN y FDA.
- Se emplearon los procedimientos PROC GLM y LSMEANS del paquete estadístico SAS.



# RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticas entre ninguno de los tratamientos a través de los tiempos de conservación en ninguna de las variables de respuesta evaluadas ( $P > 0.1$ ).

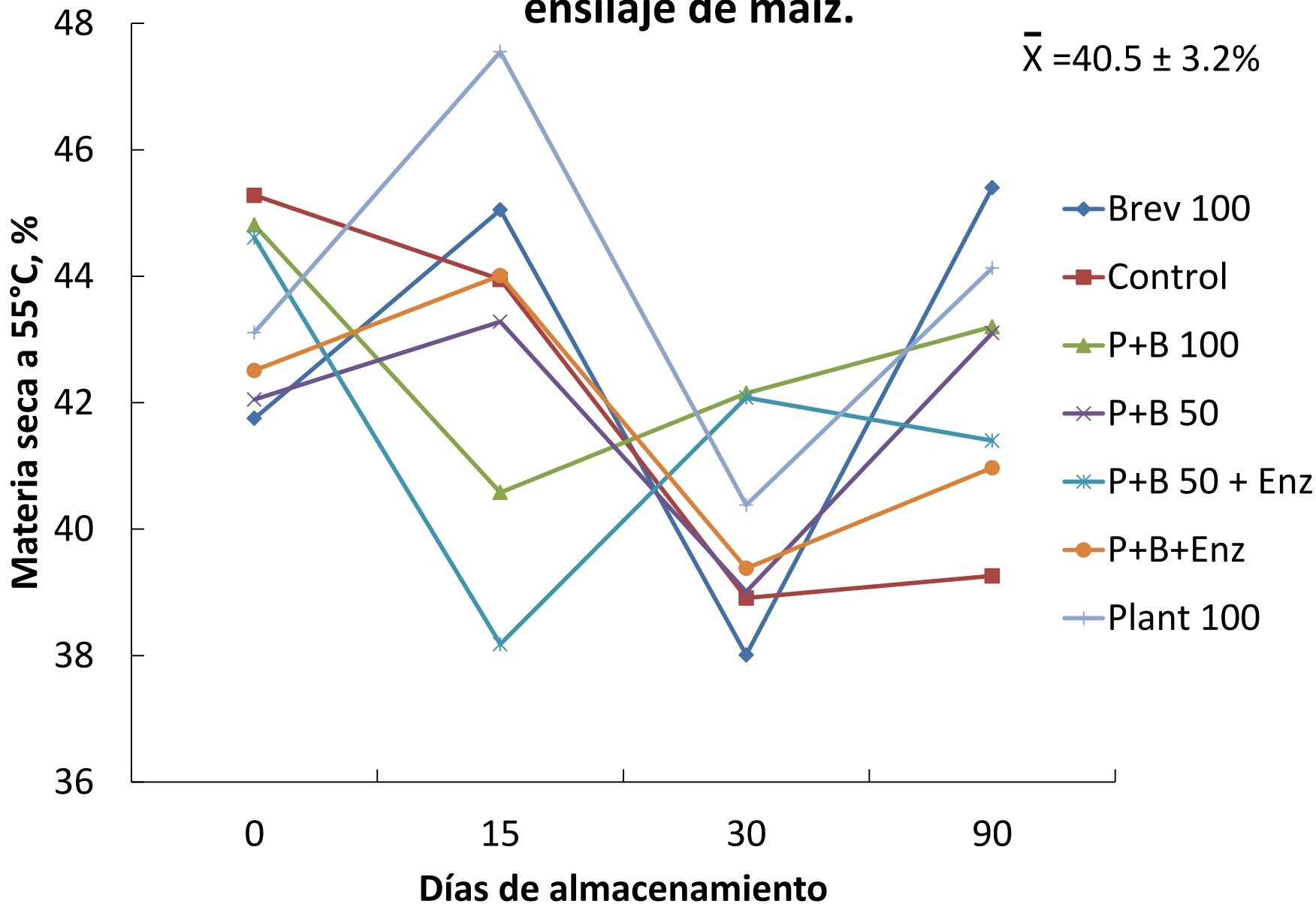


## Materia seca a 55°C

- Similar entre los tratamientos con una media de  $40.5 \pm 3.2\%$ .
- El porcentaje de materia seca a 55°C del maíz que se ensiló al tiempo cero fue de  $43.4 \pm 0.7$ , el cual fue ligeramente mayor al que recomiendan otros autores del 34 al 28% de MS al ensilar.



# Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca a 55°C de ensilaje de maíz.

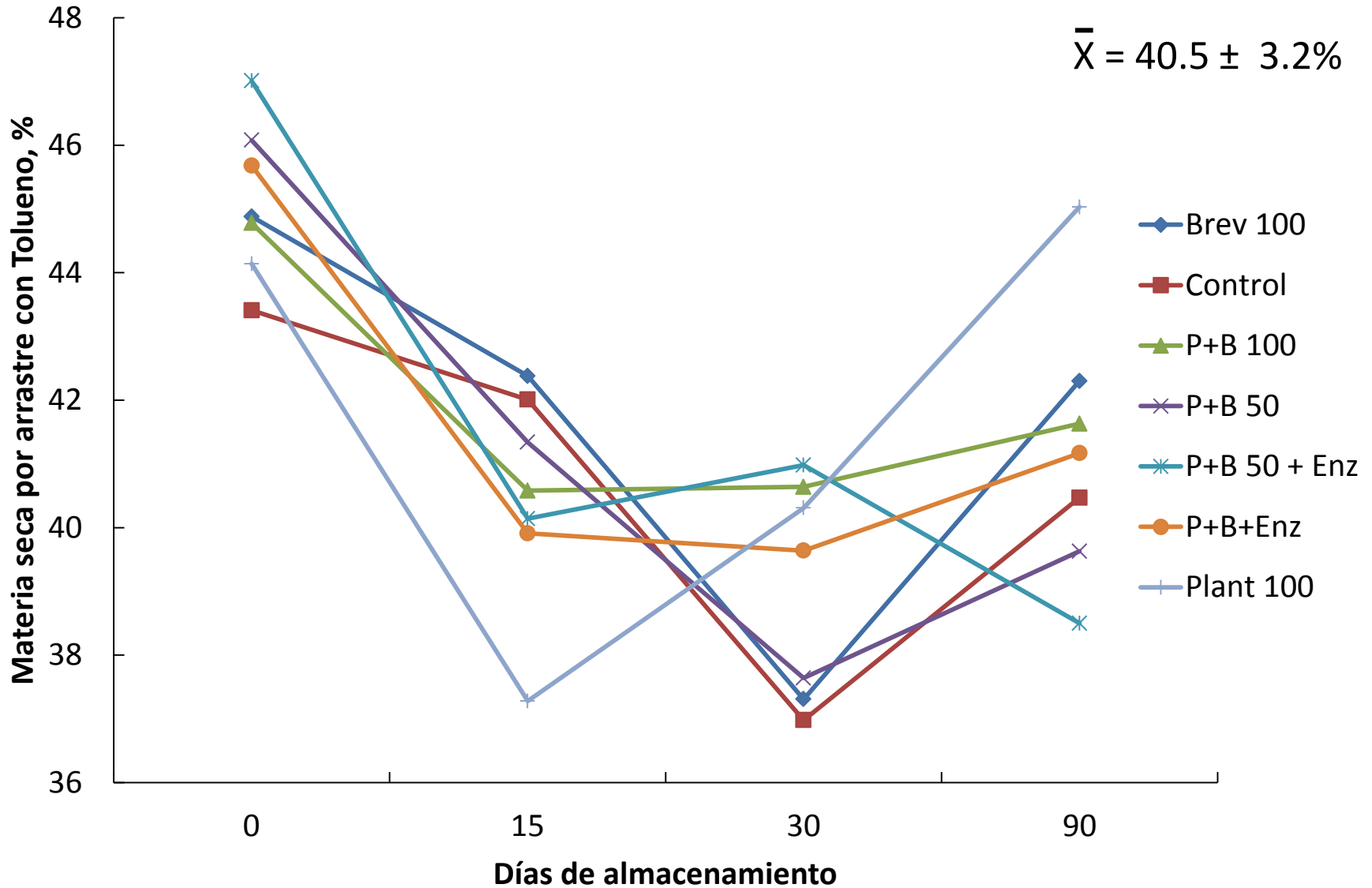


## **Materia seca por arrastre con Tolueno.**

- No se vio afectada por efecto del aditivo, siendo similar en todos los tiempos evaluados, con una media general de  $40.5 \pm 3.2\%$ .
- Probablemente debido a la poca cantidad de compuestos volátiles (nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles) obtenidos en los ensilajes.



# Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el porcentaje de materia seca por arrastre con tolueno de ensilaje de maíz.



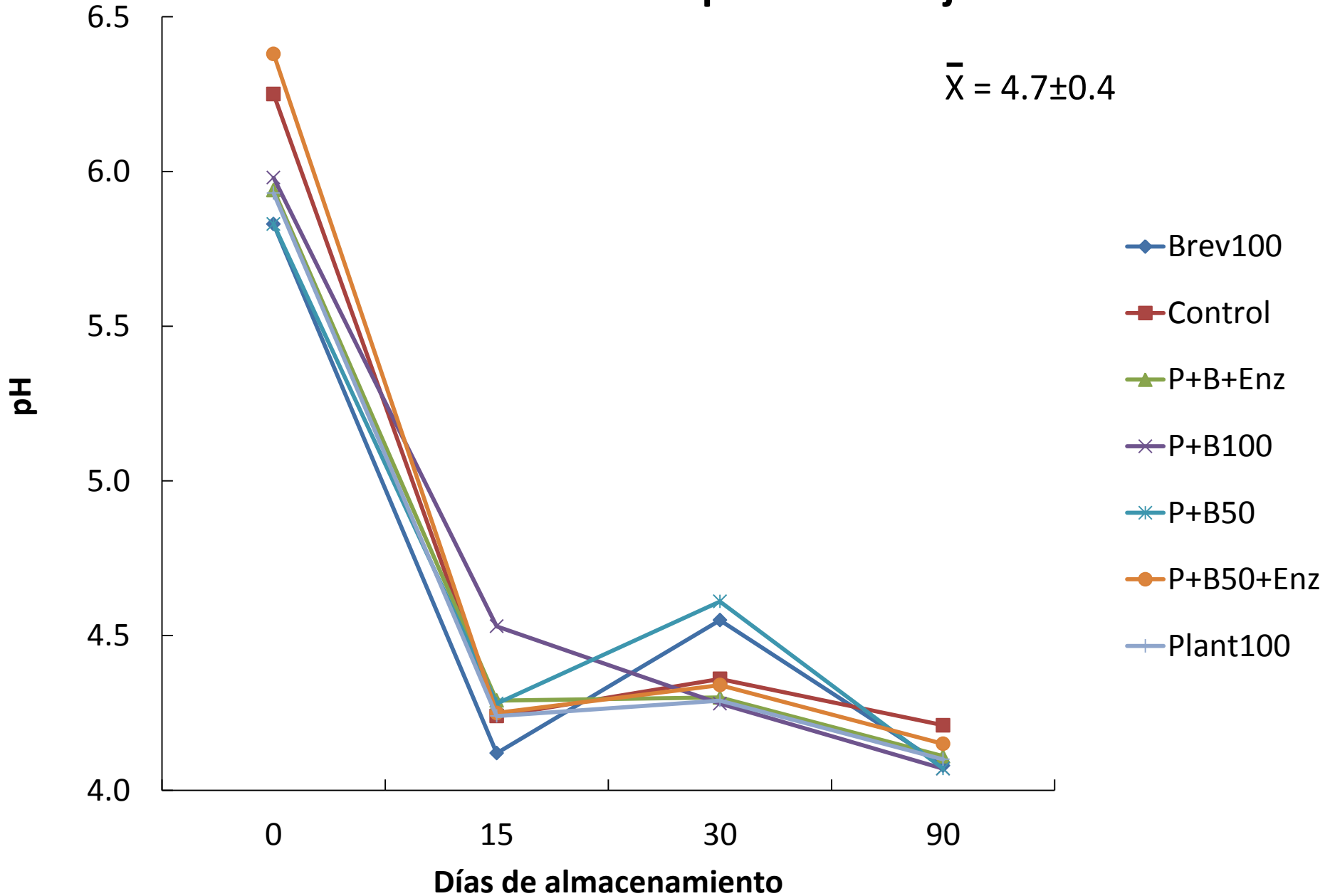
# pH

- No se presentaron diferencias significativas para el pH por efecto del tratamiento ( $P > 0.001$ ).
- Se encontró un efecto significativo relativo al tiempo de ensilado del tiempo cero a los 15 días de ensilado, lo cual era de esperarse debido al proceso de fermentación que sufrió el forraje durante el inicio de la conservación.
- La media general para pH fue de  $4.7 \pm 0.4$ .



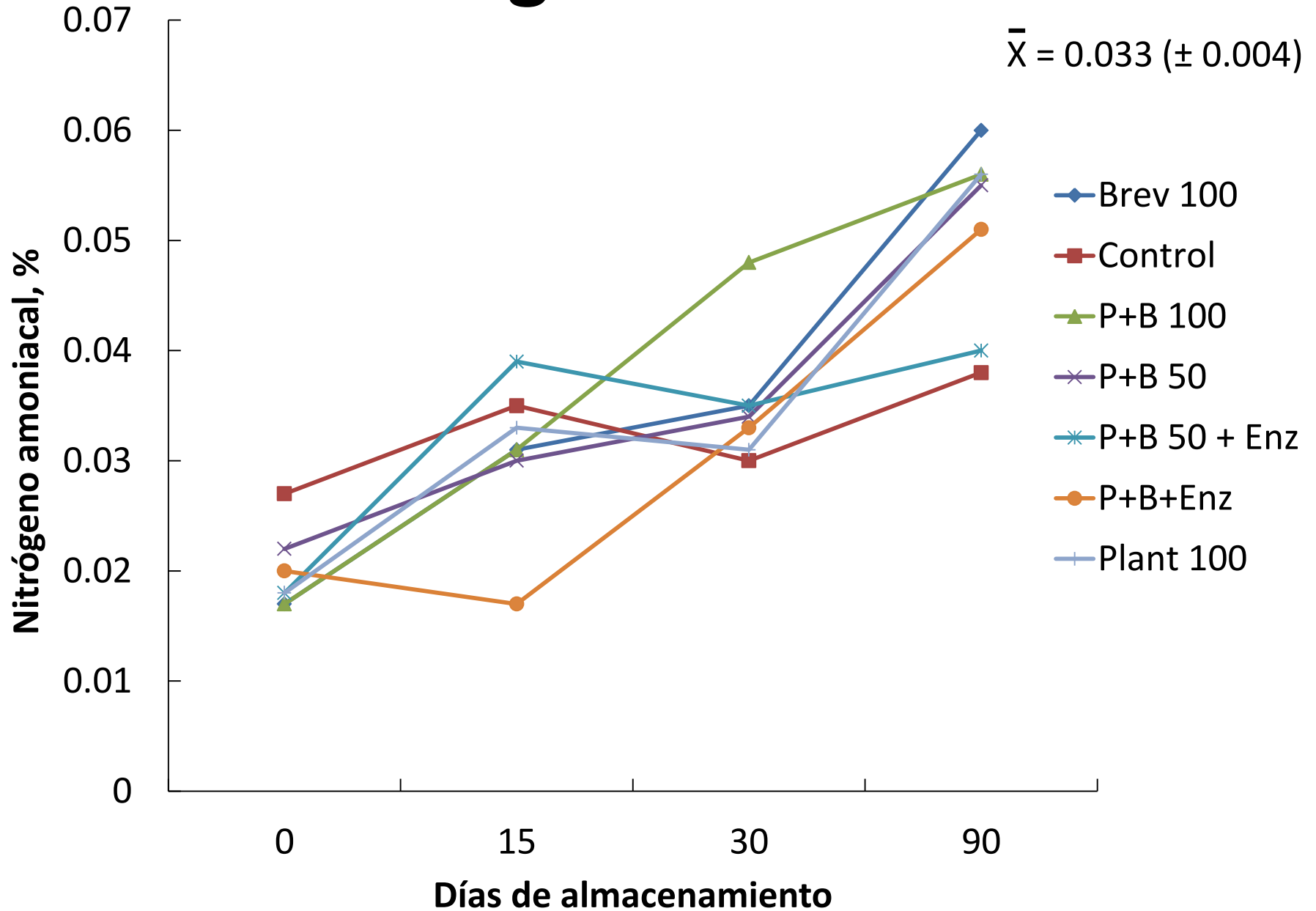
# Efecto de la inclusión de inóculos microbianos y días de almacenamiento sobre el pH de ensilaje de maíz.

$\bar{X} = 4.7 \pm 0.4$



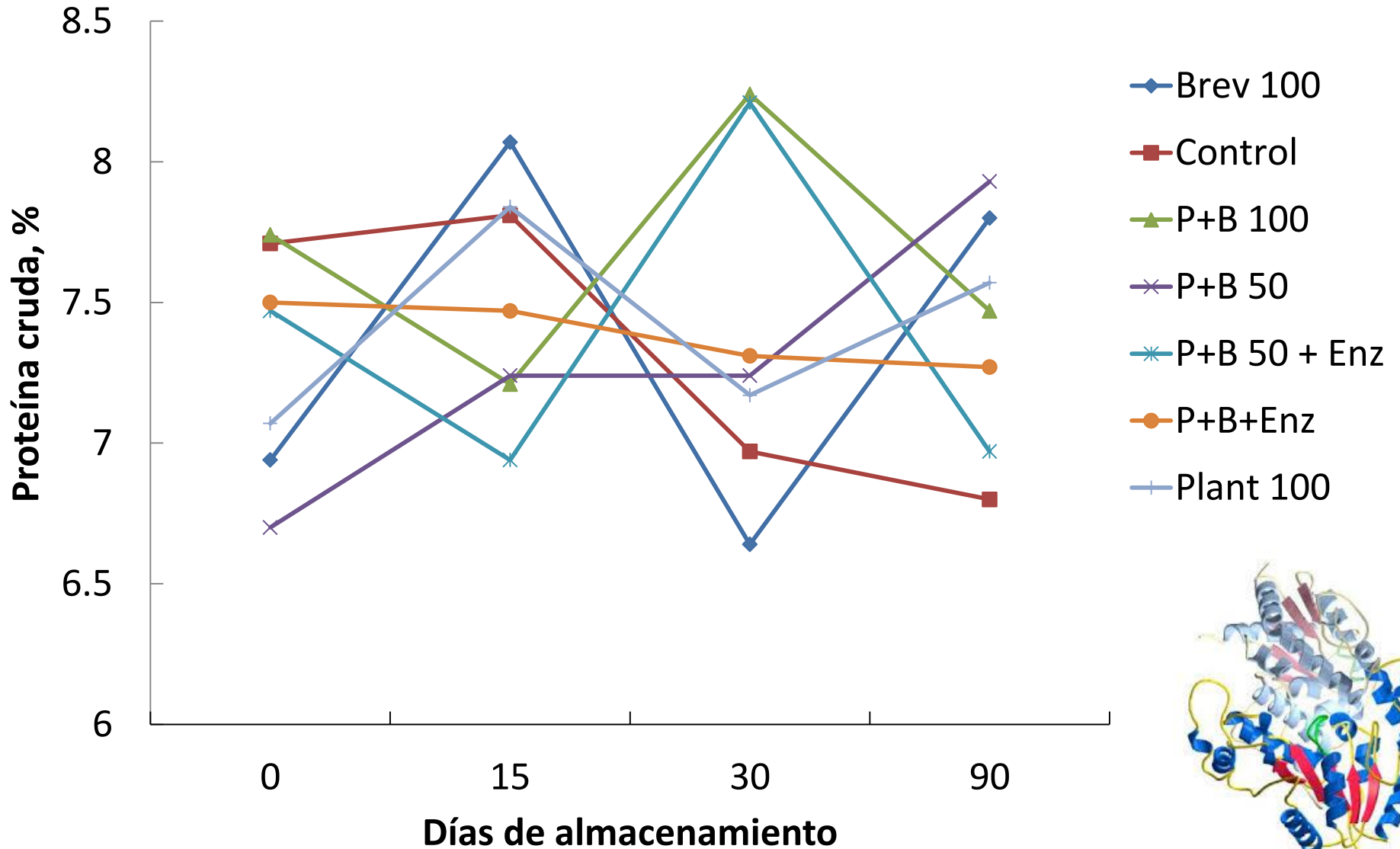


# Nitrógeno Amoniacal



# Proteína cruda

$\bar{X} = 7.2 (\pm 0.6)$

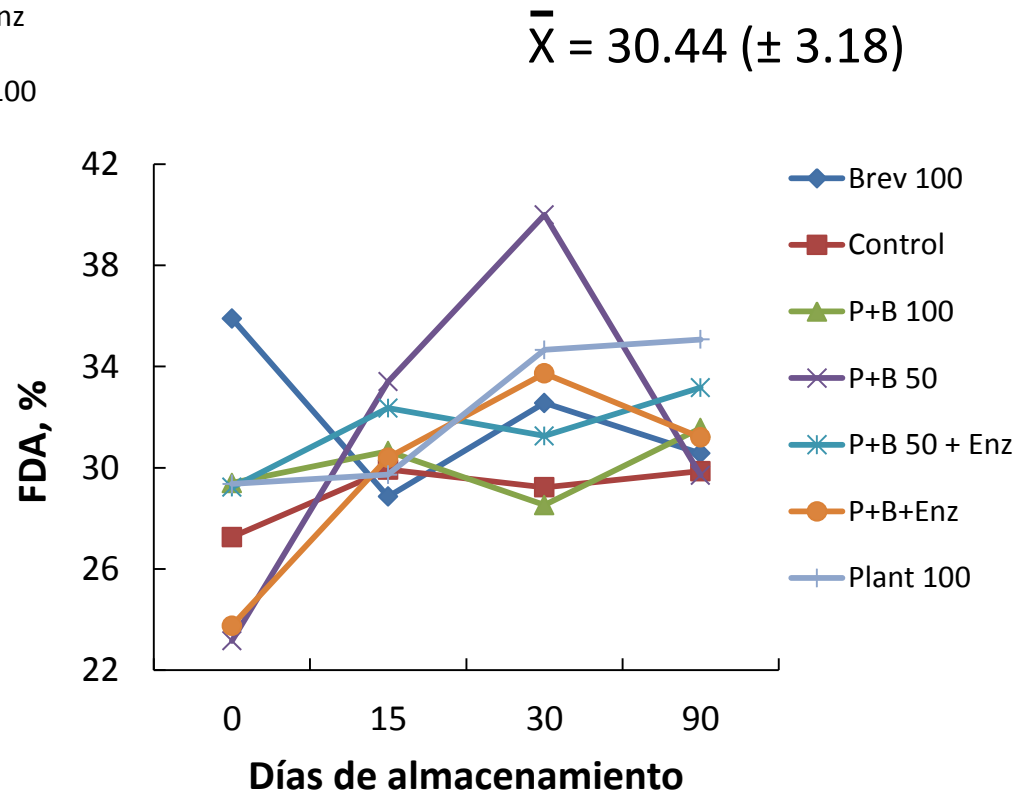
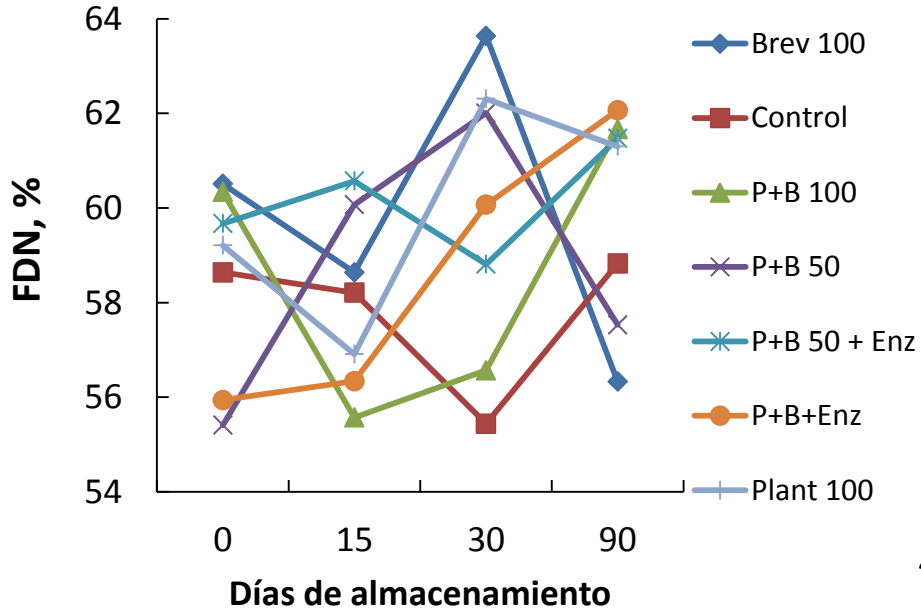


# Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

- No se detectaron ácidos grasos volátiles en ninguno de los ensilajes
  - Tal vez por la baja concentración de carbohidratos solubles del forraje original por la edad en que fue cortado?
- No se detectó ácido butírico!
- No se determinó la concentración de ácido láctico, pero la rápida disminución de pH encontrada sugiere una buena concentración de ácido láctico.



# Fracciones de Fibra



# DISCUSIÓN

- El beneficio de la inclusión de los inóculos evaluados, probablemente no se hizo evidente debido a la alta concentración de materia seca del forraje empleado, lo que sugiere que hubieron pocos carbohidratos solubles para que fueran aprovechados por las bacterias lácticas.
- La rápida reducción del pH de 6.0 al tiempo cero a 4.3 a los 15 días de ensilaje indican que el proceso de ensilaje fue el adecuado.
- No se detectaron ácidos grasos volátiles en ninguno de los tratamientos, probablemente a la baja concentración de carbohidratos solubles.



# DISCUSIÓN

- No se determinó la concentración de ácido láctico en el estudio, pero la rápida reducción del pH sugiere una buena concentración del mismo.
- Los niveles de nitrógeno amoniacal menores del 3% encontrados, sugieren una baja actividad proteolítica y una buena conservación del forraje.
- Las fracciones de fibra no fueron alteradas, lo cual indica una buena conservación de las paredes celulares del forraje para ser utilizadas por los animales.



# CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones del presente estudio, la inoculación de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* a distintas dosis, combinados con una enzima microbiana y combinados entre sí a distintas dosis, no generó cambios significativos sobre la calidad química y la capacidad fermentativa del ensilaje de maíz empleado en el presente estudio.
- El procedimiento de ensilaje empleado logró conservar las características químicas del material empleado.
- Probablemente el alto porcentaje de materia seca del forraje sugiere un bajo contenido de carbohidratos solubles para que los aprovecharan los microorganismos inoculados, por lo que sería importante evaluar estos inóculos en otro forraje con mayor contenido de humedad, de carbohidratos solubles y de nitrógeno, donde se pudiera apreciar el beneficio del empleo de este tipo de aditivos.



# Agradecimientos

- A la Dra. María Guadalupe Bernal Santos.
- Al M. en C. Konisgmar Escobar García
- A la M. en C. Araceli Aguilera Barreyro
- A la Dra Andrea Margarita Olvera
- Al M. en C. José Guadalupe Gómez Soto.
- A la Facultad de Ingeniería, en particular al Dr. Genaro M. Soto Zarazúa por el diseño y la construcción del equipo compactador
- Al M. en C. Juan Becerra Becerra del CENID-Fisiología INIFAP por proporcionar el forraje de maíz empleado en este estudio
- A la empresa SAFMEX, S.A. DE C.V. por el patrocinio del estudio
- Al Dr. Juan de Dios Garza Flores por su apoyo.
- Al Dr. Rogelio Gómez Alarcón.
- A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.
- A todos los Profesores de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro por su dedicación en mi formación.



*Muchas gracias!*

